

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б.Н. ЕЛЬЦИНА»

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор географических наук  
Г. Г. Борисова

Екатеринбург – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	8
1.1. Общая характеристика фенолов и их распространение.....	8
1.2. Поглощение фенольных соединений водными макрофитами .....	10
1.3. Фитотоксичность фенольных соединений .....	18
1.4. Процессы трансформации фенольных соединений водными макрофитами.....	21
1.4.1. Механизм действия пероксидазы .....	22
1.4.2. Механизм действия дифенолоксидазы .....	24
1.4.3. Глубокое окисление фенольных соединений.....	28
1.5. Действие экзогенных фенольных соединений на анатомо- морфологические и физиолого-биохимические характеристики водных макрофитов .....	29
1.6. Роль низкомолекулярных антиоксидантов в формировании устойчивости водных макрофитов к экзогенным фенолам.....	35
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Характеристика района исследований.....	41
2.2. Характеристика исследованных макрофитов .....	45
2.3. Методы исследований .....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	69
3.1. Исследование токсичности экзогенных фенолов на основе анализа анатомо-морфологических параметров водных макрофитов.....	69
3.1.1. Влияние экзогенных дифенолов на мезоструктуру листа водных макрофитов .....	70
3.1.2. Влияние экзогенных дифенолов на системы органов водных макрофитов .....	73
3.1.3. Флуктуирующая асимметрия водных макрофитов .....	88

3.1.4. Изменение параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата водных макрофитов из природных местообитаний, подверженных действию фенольных соединений .....	91
3.1.5. Изменение параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата водных макрофитов при совместном действии фенолов и тяжелых металлов .....	96
3.2. Физиолого-биохимические особенности водных макрофитов при действии фенольных соединений .....	100
3.2.1. Активность дифенолоксидазы в листьях водных макрофитов .....	101
3.2.2. Физиолого-биохимические особенности водных макрофитов из природных местообитаний с разной степенью фенольного загрязнения .	105
3.2.3. Физиолого-биохимические адаптации водных макрофитов в условиях фенольного загрязнения .....	113
3.2.4. Оценка способности водных макрофитов аккумулировать азот и фосфор в условиях фенольного загрязнения.....	117
3.2.5. Изменение содержания фотосинтетических пигментов водных макрофитов в условиях фенольного загрязнения .....	121
3.2.6. Ответные реакции водных макрофитов на раздельное и совместное действие фенольных соединений .....	128
3.2.7. Ответные реакции водных макрофитов на раздельное и совместное действие фенольных соединений и тяжелых металлов .....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	141
ВЫВОДЫ .....	142
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	142
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	167

## ВВЕДЕНИЕ

**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 гидросистемы, 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 гидротока, 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 формирование 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.

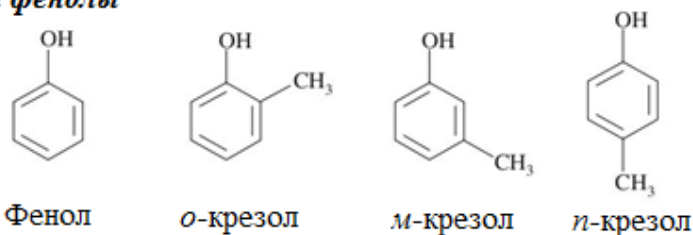
## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика фенолов и их распространение

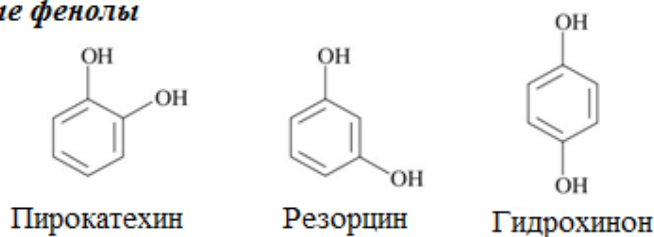
ФС представляют собой гидроксильные производные ароматических углеводородов, они разнообразны по своему химическому строению и весьма лабильны.

Все фенолы содержат в своей молекуле ароматическое ядро с одной, двумя или более гидроксильными группами. Простейшим фенольным соединением является фенол, содержащий одну оксигруппу. Среди двухатомных фенолов выделяют гидрохинон, резорцин, пирокатехин. К трехатомным относятся пирогаллол, флороглюцин и оксигидрохинон (Кунаева, Балтабаева, 1979). К числу наиболее распространенных фенольных компонентов сточных вод относятся фенол, пирокатехин, гидрохинон, гваякол и *n*-крезол (Стом и др., 1978). Структурные формулы одно-, двух- и трехатомных ФС представлены на рис 1.

#### Одноатомные фенолы



#### Двухатомные фенолы



#### Трехатомные фенолы

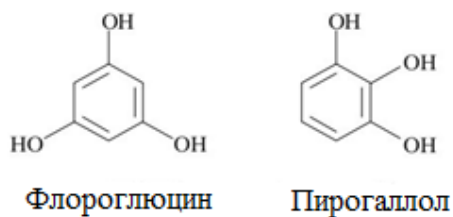


Рис. 1. Структурные формулы одно-, двух- и трехатомных фенолов

Обычно простейшие фенолы существуют только в одной – енольной форме и возможность таутомерии для них отсутствует. С увеличением числа



гидроксильных групп или введением в *орто*- и *пара*-положения заместителей, обладающих значительным отрицательным эффектом сопряжения, а также при образовании фенолят-ионов, разность между энергией енолизации и ароматического сопряжения снижается и становятся возможными таутомерные превращения их в циклогексадиеноны (Ершов и др., 1972). Число известных фенольных соединений очень велико и составляет около 2 тыс. (Запрометов, 1993).

Фенолы используются для дезинфекции, изготовления клеев и фенолформальдегидных пластмасс; входят в состав выхлопных газов бензиновых и дизельных двигателей (Фелленберг, 1997), присутствуют в больших количествах в сточных водах нефтеперерабатывающих, лесохимических, аминокрасочных и ряда других предприятий (Янин, 2004). 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 (Янин, 2004). В продуктах термического разложения каменных углей содержатся преимущественно монофенол, его моно- и диалкилпроизводные – крезолы и ксиленолы. Содержание полифенолов ограничено небольшой долей резорцина и пирокатехина. В продуктах пирогенной переработки бурых углей и торфа содержание и набор многоатомных фенолов увеличиваются за счет производных пирокатехина (Турский, Филиппов, 1967). Содержание многоатомных фенолов, из которых наибольшую (до 80%) долю составляют резорцин и его алкилпроизводные, доходит до 80–94% от суммарной смеси фенолов термического разложения горючих сланцев (Лилле, Кундель, 1967). Основным источником поступления фенолов в водоемы служат сточные воды ЦБК (Грушко, Кожова, 1978). Древесина, являющаяся сырьем для ЦБК, уже исходно содержит различные водорастворимые фенолы. Но одним из существенных источников фенолов в стоках ЦБК является лигнин. В водном гидролизате лигнина обнаружено более 20 различных фенолов (Никитин и др., 1978).

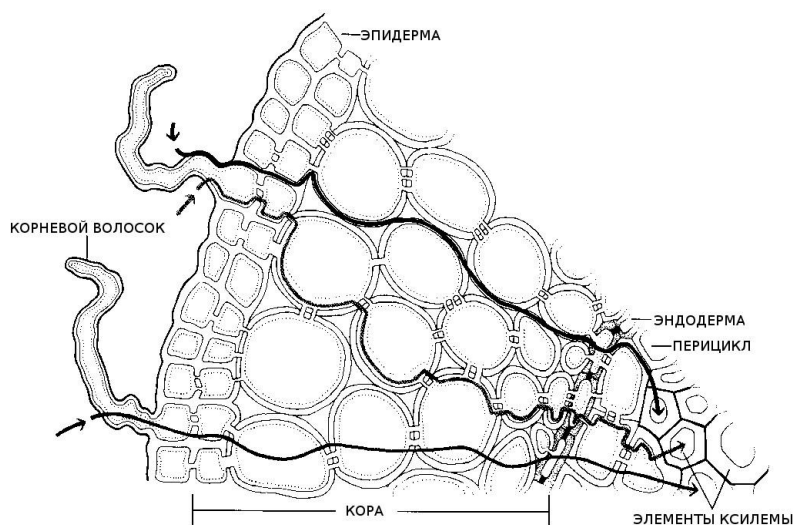
В природных водах фенолы обычно находятся в растворенном состоянии в виде фенолятов, фенолят-ионов и свободных фенолов. Они могут вступать в реакции конденсации и полимеризации, образуя сложные соединения. В большинстве случаев сброс сточных вод, содержащих ФС, в водотоки и водоемы ухудшает их экологическое состояние, оказывая влияние на живые организмы не только за счет токсичности фенолов, но и в результате существенного изменения режима поступления биогенных веществ и растворенных газов. Например, в реках Курской области средняя концентрация фенолов находится на уровне 0,25 мг/л, но даже столь маленькое содержание влияет на вкус воды и рыбы (Янин, 2004).

Фенолы обладают выраженной биологической активностью. Характер этой активности разнообразен и определяется особенностями строения тех или иных гомологов, большинство из которых токсично. Поэтому по мере увеличения в водоемах содержания фенолов все более остро ощущается необходимость сведений о вкладе различных водных организмов в устранение или обезвреживание фенолов и о резистентности к ним гидробионтов (Кирсо и др., 1988).

## **1.2. Поглощение фенольных соединений водными макрофитами**

Способность растений к поглощению ФС подтверждается многочисленными экспериментальными данными (Glass et al., 1971; Nzengung et al., 2003; Квеситадзе и др., 2005; Tront, 2009). Большинство ФС проникают в листья и корни водных макрофитов в виде растворов (Стом, 1982; Roy, Hänninen, 1994; Быкова и др., 2011). У водных макрофитов, произрастающих полупогруженно, проникновение ФС в листья может происходить через устьица или эпидермис (Квеситадзе и др., 2005). У погруженных растений, не имеющих устьиц, проникновение через эпидермис является единственным путем поступления токсикантов в листья (Квеситадзе и др., 2005). В корни токсичные вещества, в том числе ФС, поступают с непрерывным потоком воды. К транспортирующей ткани – ксилеме – они в основном передвигаются по апопласту, свободному внеклеточному

пространству. Сравнительно малое количество токсикантов движется по симпласту (рис. 2) – через клетки и соединяющие их плазмодесмы (Квеситадзе и др., 2005).



**Рис. 2. Основные пути перемещения воды с растворенными токсикантами в ксилемные элементы корня (по Raven et al., 1992)**

Способность к поглощению ФС водными макрофитами во многом определяется липофильностью поглощаемого вещества. Мерой измерения гидрофобности вещества принято считать логарифм коэффициента распределения октанол/вода ( $\log K_{OW}$ ) (Hellström, 2004). Значения  $\log K_{OW}$  для простейших ФС представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Значения коэффициента  $\log K_{OW}$  для некоторых ФС**

Фенольное соединение	$\log K_{OW}$	Источник информации
Монофенол	1,48	Environment Agency..., 2008
Резорцин	0,93	Beezer et al., 1980
Гидрохинон	0,56	Рудаков и др., 2004
Пирокатехин	0,91	Рудаков и др., 2004
Пирогаллол	0,84	Погребняк, Степанова, 2003
Флороглюцин	0,84	Погребняк, Степанова, 2003

Известно, что наиболее активно поглощаются вещества с умеренной гидрофобностью, у которых значение  $\log K_{OW}$  находится в пределах 0,5–3,0 (Корте и др., 1996).

Было показано, что процесс поглощения ФС водными макрофитами протекает в две фазы. В первой, быстро протекающей фазе, происходит диффузия ФС из внешней среды. Вторая фаза представляет собой процесс медленного накопления ФС в растительной ткани и описывается уравнением первого порядка (Tront, 2009). В экспериментах по оценке способности *Letna minor* к поглощению ФС было показано, что при концентрации 0,46–2,59 мг/л 2,4,5-ТХФ и сырой массе растений 6–15,7 г/л быстрое начальное снижение концентрации поллютанта (на 5–20%) наблюдалось в течение первых 5 минут экспозиции. В последующие 48 часов исходные концентрации 2,4,5-ТХФ постепенно снижались до нулевой отметки (Tront, 2009). В исследованиях S.D. Wolf с соавт. (1991) результаты по накоплению 1,2,3,4-тетрахлорбензола и 1,2-дихлорбензола водными макрофитами *Myriophyllum spicatum*, *Hydrocotyle verticillata* и *Vasopa caroliniana* были сходными для живых и инактивированных побегов в первые 3 часа экспозиции, после чего мертвые побеги накопили значительно больше загрязнителя по сравнению с живыми побегами. Приведенные данные свидетельствуют о том, что на начальной стадии происходит диффузионное проникновение веществ, после чего включаются механизмы их активного транспорта.

Интенсивность процесса поглощения зависит от молекулярной массы токсиканта, его концентрации, полярности, pH, температуры и многих других факторов (Söchtig, 1964; Hafez et al., 1998; Korte et al., 2000; Квеситадзе и др., 2005).

Водные макрофиты способны поглощать весьма широкий спектр ароматических углеводородов и ФС (Lockhart et al., 1981; Gobas et al., 1991; Wolf et al., 1991; Ensley et al., 1994; Roy et al., 1994).

На наземных растениях было показано, что они сравнительно легко поглощают органические вещества, молекулярная масса которых не превышает 1000 дальтон (Söchtig, 1964). Эта закономерность справедлива и для водных макрофитов. Наяда мелкозубчатая (*Najas microdon*) способна к поглощению одноатомных и двухатомных фенолов. В растворах ФС с первоначальной концентрацией 50 мг/л в присутствии наяды, плотность фитомассы которой составляла 5 г/л, происходило снижение содержания монофенола на 34%, пирокатехина на 77%, гидрохинона на 49%, резорцина на 39% (Быкова и др., 2011). Исследователями К. Seidel с соавт. установлено, что одно растение камыша озерного (*Scirpus lacustris*) при биомассе 100 г способно извлечь из воды 4 мг монофенола. Также известна способность *Scirpus lacustris* к поглощению производных фенола: *n*-крезола, ксиленола, пирокатехина, резорцина, гидрохинона, пирогаллола, пиридина и др. (Seidel et al., 1961). Список видов, способных извлекать из воды ФС, постоянно расширяется (табл. 2).

Таблица 2

**Виды водных и прибрежно-водных растений, у которых показана  
способность к извлечению фенольных соединений**

<b>Виды растений</b>	<b>Фенольное соединение</b>	<b>Источник информации</b>
<i>Scirpus lacustris</i>	Монофенол	Seidel et al., 1967
<i>Eichhornia crassipes</i>	Монофенол	Wolverton et al., 1976
<i>Nitella sp.</i>	Монофенол, пирокатехин, гидрохинон, гваякол	Стом, 1982
<i>Elodea canadensis</i>	Монофенол, пирокатехин гидрохинон, <i>n</i> -крезол	Стом, 1982
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Монофенол, пирокатехин, гваякол, <i>n</i> -крезол	Стом, 1982

<b>Виды растений</b>	<b>Фенольное соединение</b>	<b>Источник информации</b>
<i>Oedogonium sp.</i>	Монофенол, пирокатехин, гидрохинон	Стом, 1982
<i>Chara fragilis</i>	Монофенол, пирокатехин, гидрохинон, гваякол, <i>n</i> -крезол	Стом, 1982
<i>Vallisneria spiralis</i>	Пирокатехин, гидрохинон	Кирсо и др., 1988
<i>Ceratophyllum submersum</i>	Пирокатехин, гидрохинон	Кирсо и др., 1988
<i>Riccia sp.</i>	Пирокатехин, гидрохинон	Кирсо и др., 1988
<i>Eichhornia crassipes</i>	Пентахлорфенол	Roy, Hänninen, 1994
	2,4-дихлорфенол	Ensley et al., 1994
<i>Lemna gibba</i>	Монофенол	Barber et al., 1995
<i>Typha sp.</i>	Монофенол	Polprasert et al., 1996
<i>Eichhornia crassipes</i>	Монофенол	Nora-Malaver et al., 1997
<i>Lemna gibba</i>	2,4,5-трихлорфенол	Ensley et al., 1997; Sharma et al., 1997
<i>Potamogeton crispus</i>	Монофенол	Hafez et al., 1998
<i>Lemna minor</i>	2,4-дихлорфенол, 2,4,5-трихлорфенол	Day, 2002
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Монофенол	Newsted, 2004

<b>Виды растений</b>	<b>Фенольное соединение</b>	<b>Источник информации</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	Монофенол	Scragg et al.,2006
<i>Lemna minor</i>	3-фторфенол, 3-трифторметилфенол, 4-трифторметилфенол, 4-фторфенол	Reinhold, 2006
<i>Lemna minor</i>	2,4,5-трихлорфенол, 2,3,5-трихлорфенол, 2-хлор-3,5-дифторфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,6-дихлорфенол, 4-хлор-2-фторфенол, 2,6-дифторфенол, 4-хлорфенол, 4-фторфенол, 2,3,5-трифторфенол, 3,5-дифторфенол, 2-хлор-4-фторфенол	Tront, 2007
<i>Najas microdon</i>	Монофенол, пирокатехин, гидрохинон, резорцин, <i>o</i> -крезол, тимол, <i>m</i> -аминофенол, 1-нафтол, 2-нафтол	Быкова и др., 2011

Следует отметить, что растения могут поглощать и более крупные молекулы, молекулярная масса которых равна более 4000 дальтон (Lawlor, 1970).

Так как ФС поступают в растения с потоком воды, для прибрежно-водных макрофитов интенсивность их поглощения определяется влажностью почвы. С понижением водного потенциала почвы уменьшается и количество поглощенного растением токсичного соединения (Квеситадзе и др., 2005). В

частности, монофенол слабо связывается с почвой, он легко вымывается в поверхностные и грунтовые воды (European Union Risk..., 2006). В связи с этим достаточное количество почвенной влаги является необходимым условием для поглощения ФС корневой системой растений.

При поглощении ФС водными макрофитами важное значение имеет рН водной среды и донных отложений. От значения кислотности среды зависит адсорбция ФС донными отложениями, количество соединений в протонированной и депротонированной форме, проницаемость поглощающих тканей растений (Квеситадзе и др., 2005; Tront, 2009).

Примером влияния рН на процесс поглощения ФС водными макрофитами может служить поглощение монофенола рдестом курчавым (*Potamogeton crispus*). Максимум поглощения монофенола был зафиксирован при рН среды от 5 до 6,5. При  $5 > \text{pH} > 6,5$  количество поглощенного токсиканта снижалось (Hafez et al., 1998). Известно, что в кислом растворе диссоциация фенола сильно подавлена (Беккер и др., 1992). Следовательно, монофенол поглощается водными макрофитами преимущественно в неионном виде. Следует отметить, что многие токсичные соединения усваиваются как листьями, так и корнями в основном в виде недиссоциированных молекул, т.е. молекул, не имеющих заряда (Угрехелидзе и др., 1986).

Известно, что процесс диффузии незначительно зависит от температуры (Квеситадзе и др., 2005). Однако температура имеет важное значение при активном переносе токсичных соединений, в том числе ФС. С повышением температуры усиливается транспирационный ток, возрастает скорость ферментативных реакций, что приводит к интенсификации процесса поглощения токсичных соединений (Korte et al., 2000).

Показано, что максимум поглощения монофенола рдестом курчавым отмечен при температуре водной среды 25–30° С. При температуре меньшей, чем 25° С и большей, чем 30° С, поглощение монофенола снижалось (Hafez et al., 1998).



Важным фактором, влияющим на процесс поглощения ФС водными макрофитами, является химический состав водной среды. Показано, что с увеличением содержания органического вещества в воде поглощение некоторых ФС уменьшается. Например, поглощение монофенола ряской малой (*Lemna minor*) снижалось в присутствии глюкозы и лактозы (Dianati, 2010).

Процессы поглощения ФС в значительной степени зависят от минеральной и органической составляющей донных отложений. Многие токсиканты сорбируются на липофильном органическом материале, поглощаются минеральным (глинистым) слоем, а также ковалентно связываются с гуминовыми компонентами. При десорбции не полностью извлекаются из почвы продукты реакции токсикантов с гуминовой фракцией, а также молекулы токсикантов, встроенные в слоистую структуру глинистых минералов или находящиеся в пространстве гуминовых макромолекул (Квеситадзе и др., 2005). Было показано, что некоторые гидрослюды, такие как глауконит, обладают способностью эффективно адсорбировать монофенол (Вигдорович и др., 2010). Степень адсорбции фенола на глауконите из щелочных растворов достигает 99,99% и обусловлена более интенсивной сорбцией фенолят-ионов (Вигдорович и др., 2011). Это значит, что в донных отложениях, содержащих глауконит и имеющих щелочную реакцию среды, процесс поглощения фенола водными макрофитами будет снижен как минимум по двум причинам: высокоэффективная адсорбция фенола глауконитом и снижение количества молекулярной формы фенола в связи с щелочной реакцией среды.

Значительное влияние на процесс поглощения ФС водными макрофитами оказывает минеральное питание. Например, показано, что при отсутствии элементов минерального питания поглощение монофенола корнями водного гиацинта (*Eichhornia crassipes*) возрастает (Wolverton, Mckown, 1976). В исследованиях Т.Ж. Козюкиной (1983) приводятся данные, свидетельствующие о том, что в присутствии гуминовых кислот снижается

поступление монофенола в растения. Анализ существующих данных показывает, что гуминовые вещества способствуют детоксикации загрязняющих веществ органической природы как в водных, так и почвенных средах. При этом в качестве основного механизма защитного действия гуминовых веществ предполагают связывание ими ксенобиотиков в недоступные для растений комплексы (Куликова, 2008).

Таким образом, приведенные литературные данные однозначно свидетельствуют о том, что механизмы проникновения ФС в водные макрофиты подчиняются различным закономерностям. Способность водных макрофитов противостоять действию ФС, попавших во внутриклеточное пространство, определяет в последующем весь детоксикационный потенциал растений и их устойчивость к экзогенным фенолам в целом.

### **1.3. Фитотоксичность фенольных соединений**

В отдельных исследованиях было показано, что токсичность ФС определяется уровнем концентрации и структурой токсиканта, способностью ФС к окислению, видом растения, его физиологическими особенностями, возрастом, условиями среды обитания (Стом, 1982; Моисеенко, 2009; Быкова и др., 2011; Park et al., 2012). Увеличение длины и количества алкильных заместителей в ядре уменьшает токсичность, но увеличивает персистентность и способность фенолов к аккумуляции в живых организмах. Наличие галогенов повышает токсичность фенолов (Моисеенко, 2009).

Имеющиеся в литературе данные об эффектах фитотоксичности наиболее распространенных фенольных компонентов сточных вод представлены в табл. 3.

### Эффекты фитотоксичности ФС для водных макрофитов

Вид	Эффект	Время воздействия	Концентрация ФС, мг/л	Источник информации
<b>Гидрохинон</b>				
<i>Elodea canadensis</i>	Ингибирование роста на 50%	9 дней	42,9	Stom, Roth, 1981
<i>Elodea canadensis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут 3 часа	1100 330	Стом, 1982
<i>Lemna minor</i>	Ингибирование образования новых фрондов на 50%	12 дней	7,71	Stom, Roth, 1981
<i>Vallisneria spiralis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут	2753 (в листьях) 275,3 (в корнях)	Stom, Roth, 1981
<b>Резорцин</b>				
<i>Lemna minor</i>	EC <sub>50</sub>	12 дней	165	Stom, Roth, 1981
<i>Elodea canadensis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут 3 часа	2200 1100	Стом, 1982
<i>Vallisneria spiralis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут	55050	Стом, 1982
<b>Пирокатехин</b>				
<i>Elodea canadensis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут 3 часа	5500 550	Стом, 1982
<i>Vallisneria spiralis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут	3300	Стом, 1982
<b>Монофенол</b>				
<i>Vallisneria spiralis</i>	Обездвиживание протоплазмы	15 минут	2353	Стом, 1982
<i>Lemna paucicostata</i>	Ингибирование темпов роста на 50 %	7 дней	235	Saerong et al., 2015
<i>Lemna paucicostata</i>	Дезинтеграция колоний	3 дня	2	Park et al., 2012

Исследования Д.И. Стома (1982) и собственные данные автора (Кислицина, Борисова, 2015) свидетельствуют о том, что среди одноатомных и двухатомных фенолов наиболее токсичными для высших водных растений являются пирокатехин и гидрохинон. При концентрации последних в

растворе 1,0 ммоль/л обесцвечивание стеблей и потемнение листьев отмечалось примерно на 17-е сутки. В то же время на растворах одноатомных фенолов растения росли хорошо и обнаруживали признаки активной жизнедеятельности. К примеру, сырой вес *Elodea sp.* при инкубировании в растворе монофенола (концентрация 94,1 мг/л) в течение 30 суток увеличивался на 100% (Кирсо и др., 1988).

Механизм высокой токсичности пирокатехина и гидрохинона связан с окислением данных соединений с образованием высокореакционных промежуточных продуктов, в частности, бензохинонов (Stom, 1977; Стом 1982). Угнетение фенолами физиологических процессов гидрофитов проявляется тем сильнее, чем интенсивнее идет их превращение в хиноны (Кирсо и др., 1988).

Исследования воздействия ряда экзогенных фенолов на фотосинтетический аппарат водорослей *Draparnaldiella pilosa* и *Dunaliella salina* выявили для них следующий ряд токсичности: *n*-бензохинон > гидрохинон > пирокатехин > монофенол > резорцин (Stom et al., 1974; Тимофеева и др., 1981).

Экспериментально установлено, что влияние гидрохинона и *n*-бензохинона на водоросли зависит от времени с момента приготовления раствора и экспозиции с раствором токсиканта. Свежеприготовленные или хранившиеся недолго в темноте растворы приводят к меньшему подавлению фотосинтетической ассимиляции  $^{14}\text{CO}_2$ , чем приготовленные на ярком свете и длительно хранившиеся растворы. Авторы связывают этот эффект с тем, что полимерные окрашенные продукты окисления и особенно фотоокисления *n*-бензохинона и гидрохинона являются более токсичными для водорослей при оценке их действия на фотосинтетическую ассимиляцию  $^{14}\text{CO}_2$  (Тимофеева и др., 1981).

Соединения, восстанавливающие хиноны, в частности, диолы, ослабляют фитотоксичность пирокатехина и гидрохинона, но не резорцина (*m*-дифенол). Резорцин не способен образовывать *m*-хинонов, а его окисление

приводит к сложной смеси продуктов (Робертс, Касерио,1978). Сходным образом действуют ингибиторы ДФО. Например, ДДК снижает токсичность *o*-ФС лишь для растений с активной ДФО, но не меняет эффекта в случае с *n*- и *m*-ФС (Кирсо и др., 1988).

Снижение рН растворов, концентрации в них кислорода или этерификация ФС подавляют окисление и так же, как в других случаях, ингибирование перехода ФС в хиноны уменьшает их токсичность (Кирсо и др., 1988).

Тем не менее многообразие ФС указывает на то, что хиноидный путь – лишь один из возможных для проявления их токсичности. Некоторые ФС токсичны для гидрофитов из-за повышенных электроноакцепторных свойств, способности образовывать хелатные комплексы и выступать в роли денатурирующих агентов, протонофоров или биологических депрессантов. В связи с этим, в некоторых, если не в большинстве случаев, фитотоксичность ФС отражает суммарный эффект, определяемый одновременно различными свойствами молекулы (Кирсо и др., 1988).

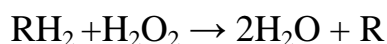
#### **1.4. Процессы трансформации фенольных соединений водными макрофитами**

Растения до конца 1980-х годов рассматривались как организмы, в основном способные лишь аккумулировать ксенобиотики во внутриклеточном пространстве, но лишенные возможности осуществлять их превращения вплоть до минерализации. Экспериментальные данные, накопленные в 90-х годах XX века, коренным образом изменили представление о деградиционной способности растений, однозначно подтвердив довольно высокий экологический потенциал высших растений (Квеситадзе и др., 2005). Многочисленные исследования ряда авторов опровергают мнение о том, что водные макрофиты не способны к биотрансформации ФС (Стом, 1982; Roy, Hänninen,1994; Sharma et al.,1997; Tront, 2007). В частности, было показано, что водные макрофиты с помощью

*o*-дифенолоксидаз и пероксидаз способны интенсивно окислять экзогенные ФС (Стом, 1982).

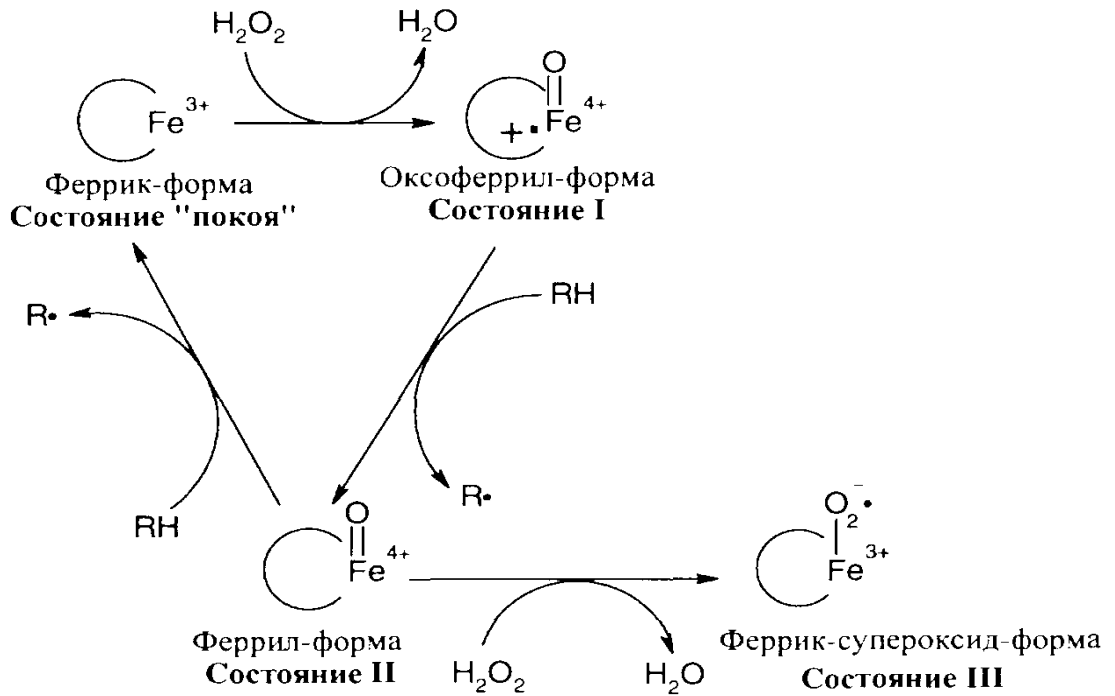
#### **1.4.1. Механизм действия пероксидазы**

Пероксидазы (1.11.1.7) – широко распространенные ферменты, обнаружены фактически во всех зеленых растениях (Siegel, 1993). Фермент локализован в клеточной стенке, в вакуолях, тонопластах, пластидах, мембранах эндоплазматического ретикулума и плазмалеммы. Пероксидаза катализирует реакцию, в которой для окисления субстрата участвует активная форма кислорода, содержащаяся в перекиси водорода (Квеситадзе и др., 2005):



Фермент состоит из одной полипептидной цепи и содержит одну структурную единицу гема в виде протопорфирина IX. Для растительной пероксидазы характерно наличие апофермента, содержащего приблизительно 25% углеводов. Этот углеводный остаток предохраняет молекулу пероксидазы от протеолиза и стабилизирует конформацию фермента до уровня, требуемого для проявления каталитической активности (Hu, Huystee, 1989).

Известно, что пероксидазы катализируют многие свободнорадикальные реакции (Stahl, Aust, 1995). В нативном состоянии фермент содержит трехвалентное железо с гемом (рис. 3).



**Рис. 3. Механизм действия пероксидазы (по Квеситадзе и др., 2005)**

В результате связывания перекиси водорода гем окисляется двумя электронами. На этой стадии каталитического акта два ключевых аминокислотных остатка – аргинин и гистидин, находясь в некотором отдалении от активного центра, включаются в активацию перекиси водорода. Гистидин действует первоначально как акцептор протона (основной катализатор), а затем как донор (кислотный катализатор) при нейтральном pH. Это способствует передаче протона от  $\alpha$ - к  $\beta$ -атому кислорода в молекуле гем-связанной перекиси. В результате O–O-связь поляризуется, происходит ее расщепление и формируется оксоферрил (состояние I). В это же время аргинин понижает значение  $pK_a$  гистидина и дополнительно присоединяется к  $\text{H}_2\text{O}_2$  в активном центре фермента (Rodriguez-Lopez et al., 2001). Оксоферрил, содержащий железо в четырехвалентном состоянии, представляет собой катионный радикал, стабилизированный в порфириновом кольце гема. Оксоферрил в два этапа восстанавливается от двух молекул окисляемого субстрата. На первой стадии посредством катион-радикала оксоферрил отщепляет от субстрата один электрон и переходит в феррил-форму (состояние II). При этом радикал и положительный заряд

нейтрализуются, но гем сохраняет четырехвалентное состояние железа. На следующем этапе происходит восстановление геминового железа до трехвалентного вторым электроном от другой молекулы субстрата и образуется феррик-форма, т.е. фермент переходит в состояние «покоя». В случае взаимодействия феррил-формы с перекисью водорода образуется каталитически неактивная феррик-супероксидная форма (состояние III), в которой трехвалентное железо гема связано с пероксидным радикалом (Квеситадзе и др., 2005).

В результате реакции, катализируемой пероксидазой, образуется продукт, содержащий радикал ( $R^{\bullet}$ ), который в состоянии окислять ксенобиотики (Квеситадзе и др., 2005).

Предполагается, что в растениях основная часть органических токсичных соединений окисляется пероксидазами (Stiborova, Anzenbacher, 1991). Эта гипотеза базируется на следующих экспериментально обоснованных соображениях: широкое распространение пероксидазы в растениях; высокое сродство с органическими ксенобиотиками различных химических структур, обеспечивающих практически универсальную субстратную специфичность (Квеситадзе и др., 2005).

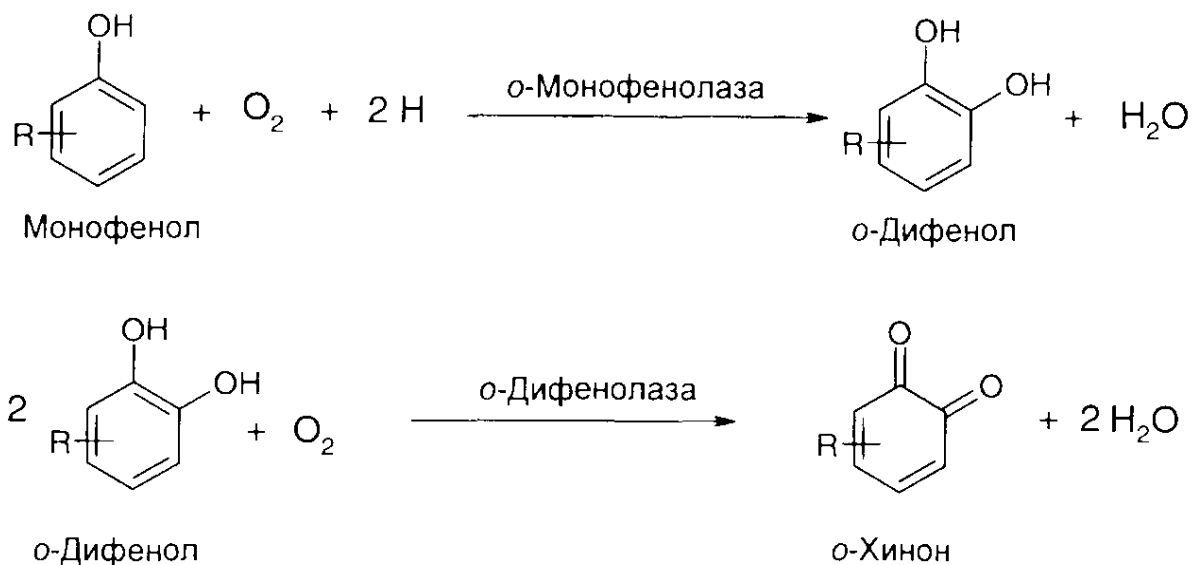
#### **1.4.2. Механизм действия дифенолоксидазы**

Дифенолоксидаза (ДФО) – медьсодержащий фермент, ферментативная активность которого была обнаружена в таких гидрофитах как: *Nitella sp.* (Стом и др., 1981), *Nitella mirabilis* (Holst, Yopp, 1976), *Chara fragilis* (Стом, 1982), *Ceratophyllum demersum* (Кислицина, Борисова, 2012; Макурина, Розина, 2012), *Potamogeton crispus*, *Elodea canadensis*, *Egeria densa*, *Potamogeton perfoliatus*, *Potamogeton alpinus*, *Lemna gibba* (Кислицина, Борисова, 2012), *Sagittaria natans*, *Alisma plantago-aquatica* (Кислицина, Борисова, 2015) и др.

ДФО катализирует дегидрогеназные и монооксигеназные реакции (Sanches-Ferrer et al., 1994): *o*-гидроксилирование монофенолов



(монофенолазная реакция) и окисление *o*-дифенолов в *o*-хиноны (дифенолазная реакция) (рис. 4).



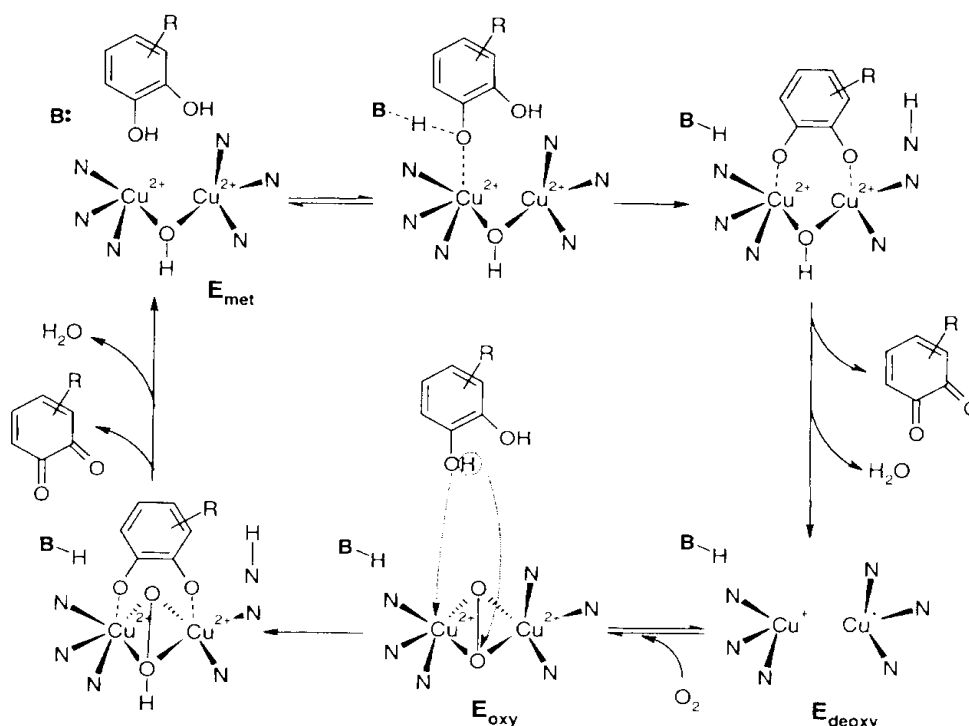
**Рис. 4. Монофенолазная и дифенолазная реакции, катализируемые дифенолоксидазой растений (по Sanches-Ferrer et al., 1994)**

Ряд данных свидетельствует о том, что ДФО активность растений сосредоточена преимущественно на границе перехода между поверхностью кортикального геля и клеточной стенкой (Stom, 1977; Stom et al., 1980, 1981; Стом и др., 1981; Zhao-al, Zi-ao, 1984), т.е. в наружной части клетки. Было показано, что благодаря поверхностной локализации фермента повреждающее действие экзогенных ФС на компоненты цитоплазмы может ослабляться (Кирсо и др., 1988).

В работе Rodriguez-Lopez с соавт. (2000) представлен возможный механизм действия тирозиназы. Тирозиназа – типичный представитель дифенолоксидаз и имеет *мет*-, *дезокс*- и *окси*-формы (рис. 5). Эти формы зависят от состояния двух ионов меди в двуядерном активном центре, где они находятся в окружении шести атомов азота гистидиновых остатков. Эти формы отличаются в первую очередь валентностью ионов металла: в *мет*- и *окси*-формах ионы меди двухвалентны, а *дезокс*-форма содержит одновалентную медь. С субстратом (например, с *o*-дифенолом) могут

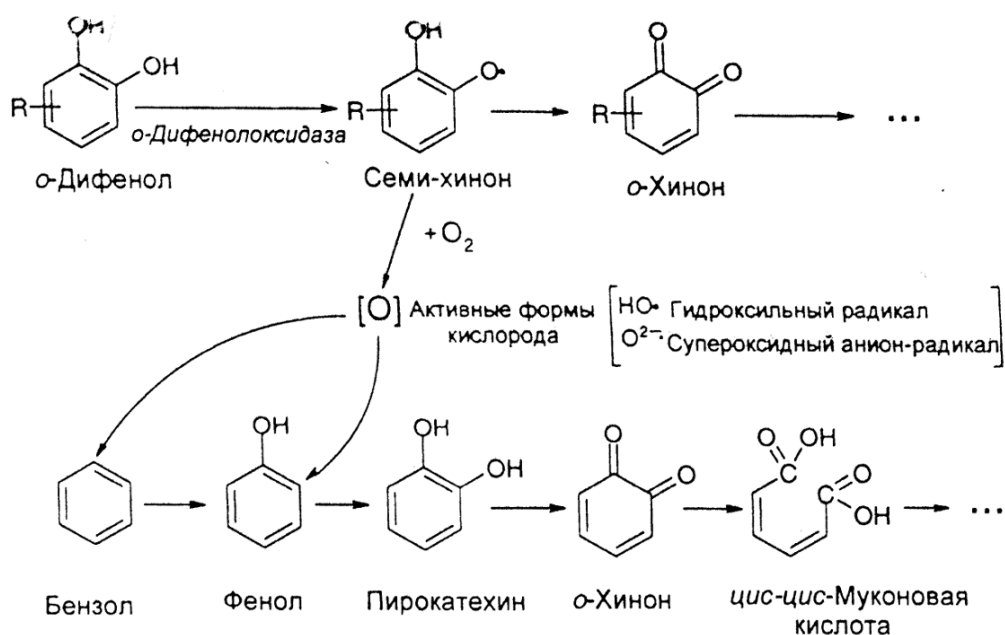
связываться *мет*-и *окси*-формы, а *дезокс*-форма не обладает такой способностью. Кислород, участвующий в окислении фенолов, наоборот, способен связываться только со свободной *дезокс*-формой.

*o*-Дифенолазная реакция начинается связыванием *o*-дифенола с одним из двух ионов меди (II) (на схеме – с левым) в *мет*-форме фермента (на схеме –  $E_{met}$ ). Процесс сопровождается переходом протонов от гидроксильных групп *o*-дифенола на активный центр фермента. Первый из них нацелен на апофермент (на схеме обозначен как В), а второй – на атом азота гистидинового остатка. Далее происходит реакция окисления *o*-дифенола: электроны от субстрата переходят на ионы меди (II). В результате образуется *o*-хинон, а фермент переходит в *дезокс*-форму, которая имеет двуядерный активный центр, где металлические ионы находятся в одновалентном состоянии. Эта форма способна быстро связывать молекулу кислорода, вследствие чего фенолоксидаза переходит в *окси*-форму. *Окси*-форма фермента, как и *мет*-форма, способна связывать молекулу *o*-дифенола и осуществлять ее окисление (Rodriguez-Lopez et al., 2000).



**Рис. 5. Механизм действия дифенолоксидазы (по Rodriguez-Lopez et al., 2000)**

Кроме основной функции – окисления ФС, дифенолоксидаза может также активно участвовать в окислении других органических ксенобиотиков. Механизм действия фермента может оказаться разным в зависимости от химической природы ксенобиотика. Если ксенобиотик имеет фенольную природу, то он может являться субстратом фермента и будет окисляться по обоим – монофенолазному и дифенолазному – путям. В другом случае, т.е. если ксенобиотик не является субстратом для фенолоксидазы, предполагается существование механизма соокисления ксенобиотика вместе с эндогенными фенолами (Квеситадзе и др., 2005). В частности, показано, что ДФО эффективно окисляет ароматические углеводороды, такие как бензол и толуол, осуществляя их гидроксילирование с дальнейшим образованием хинона (рис. 6) (Ugrekheldidze et al., 1997).



**Рис. 6. Механизм соокисления бензола при окислении *o*-дифенола дифенолоксидазой (по Ugrekheldidze et al., 1997)**

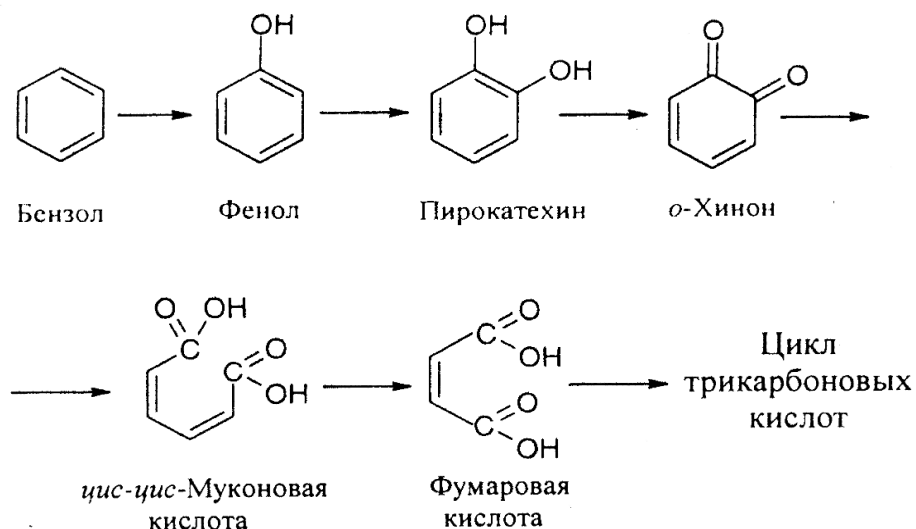
В данном случае фермент окисляет эндогенный фенол, образуя семихинон и хинон, которые имеют высокий окислительно-восстановительный потенциал. Они могут активировать молекулярный кислород и формировать активные формы кислорода, например, супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный радикал ( $HO\cdot$ ) (Guillen

et al., 1997; Guillen et al., 2000), которые обладают способностью окислять органические ксенобиотики. Формирование свободных радикалов дает возможность ДФО активно участвовать в детоксикационных процессах при помощи механизма соокисления (Квеситадзе и др., 2005).

### 1.4.3. Глубокое окисление фенольных соединений

Первые экспериментальные данные о способности растений расщеплять ароматическое ядро ФС были опубликованы М.Н. Запрометовым (1959). В 1967 г. на примере  $^{14}\text{C}$  бензола и фенола было показано, что высшие растения способны метаболизировать указанные вещества путем расщепления ароматического кольца и использовать их в качестве источников энергии и углерода (Дурмишидзе и др., 1974). Углеродные атомы этих соединений в результате клеточного метаболизма включаются в молекулы таких эндогенных метаболитов, как карбоновые кислоты и аминокислоты (Квеситадзе и др., 2005). В результате окисления растениями фенола образуется продукт расщепления ароматического кольца – муконовая кислота (рис. 6) (Дурмишидзе и др., 1969). Муконовая кислота часто обнаруживается в растениях, «поглотивших» бензол или фенол. Дальнейшее окисление муконовой кислоты ведет к формированию фумаровой кислоты, которая почти всегда идентифицируется в растениях, инкубированных с радиоактивным бензолом или фенолом. Интересно, что расщепление ароматического кольца эндогенных субстратов происходит аналогичным образом – когда из 3,4-дигидроксибензойной кислоты образуется 3-карбоксимуконовая кислота (Tateoka, 1970).

Биохимическое окисление ФС может идти двумя путями: через хиноидную стадию или минуя ее. Окисление гидрофитами *o*- и *n*-ФС, одноатомных ФС и ароматических углеводов идет через стадию хинонов (Стом, 1982) (рис. 7).



**Рис. 7. Метаболизм бензола в высших растениях с разрывом ароматического ядра (по Дурмишидзе и др., 1969)**

Последующая конденсация хинонов сопровождается образованием ярко окрашенных полимерных продуктов: возможно также замыкание хинонов на биохимически важные группы белков и другие компоненты растительных тканей. Путь поликонденсации с выделением полимерных продуктов примечателен тем, что исключает проявление токсичных свойств промежуточных продуктов биотрансформации (Тимофеева, 1981).

Механизм трансформации ФС через хиноны является универсальным – он имеет место в сточных водах, а также при окислительной деструкции эндогенных фенольных соединений в растительной клетке под действием повреждающих факторов (Стом, 1982).

### **1.5. Действие экзогенных фенольных соединений на анатомо-морфологические и физиолого-биохимические характеристики водных макрофитов**

Важную роль в формировании устойчивости растений к стрессорам различной природы играет структурно-функциональная организация клеток. Каждая растительная клетка представляет собой самостоятельно функционирующую единицу. Протекающие в организме процессы слагаются из совокупности скоординированных функций всех клеток (Квеситадзе и др.,

2005). Выявление связей между структурно-функциональными характеристиками растений и условиями их обитания привлекает большое внимание в связи с возможностью прогнозирования реакций видов при антропогенных воздействиях (Кислицина, Борисова, 2012). Эта проблема весьма важна с экологической точки зрения, т.к. от устойчивости растений к действию антропогенных загрязнителей, в том числе фенольной природы, во многом зависит существование гидроценоза в целом.

К настоящему времени влияние экзогенных ФС на структурно-функциональную организацию клеток водных макрофитов изучено очень слабо. В литературе встречаются сведения о влиянии элементов минерального питания на анатомо-морфологическую структуру водных растений. Однако литературные данные о влиянии ФС на структурно-функциональную организацию клеток водных макрофитов весьма немногочисленны.

Г.И. Квеситадзе с соавторами было выделено три уровня концентрации ксенобиотиков в зависимости от степени воздействия на растительную клетку:

***при метаболической концентрации токсичных соединений*** в ультраструктуре клетки не отмечается видимых отклонений от нормы. Эта доза соответствует наиболее часто встречающейся в природе концентрации антропогенных органических токсикантов (Квеситадзе и др., 2005). Так, например, при концентрациях пирокатехина, гидрохинона и резорцина  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  М и ниже харовые водоросли сохраняют свою жизнедеятельность и активно метаболизируют фенолы (Тимофеева, 1981);

***концентрация, ингибирующая клеточные процессы***, приводит к заметным изменениям в ультраструктуре клетки, нарушению биосинтеза нуклеиновых кислот и кальциевого гомеостаза;

***летальная концентрация*** ведет к полной деструкции клетки и гибели растения за короткий промежуток времени (Квеситадзе и др., 2005). В частности, при изучении действия фенольных токсикантов на харовые

водоросли показано, что остановка движения протоплазмы харовых наблюдается через 15 мин при обработке растворами в концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  М пирокатехина,  $2,5 \cdot 10^{-2}$  М гидрохинона,  $5 \cdot 10^{-2}$  М резорцина (Тимофеева, 1981).

В результате действия экзогенных фенолов в клетках растений также возникает комплекс морфологических изменений, которые связаны с нарушением структурной организации клетки (Квеситадзе и др., 2005; Кислицина, Борисова, 2012). В частности, показано, что фенол, *o*-нитрофенол, 2,4-динитрофенол, *o*-крезол в концентрациях  $10^{-3}$  М вызывают патологические нарушения клеточной ультраструктуры листьев растений (Месхи, 1973). В одной из работ, посвященной изучению комплексного загрязнения (Капитонова, 2002), показаны количественные и качественные изменения в строении эпидермы вегетативных органов *Typha latifolia*, *Alisma plantago-aquatica* и *Lemna minor*. В наибольшей степени проявляли изменчивость линейные размеры эпидермальных клеток. Кроме того, прослеживалась тенденция увеличения их плотности и возрастания количества устьиц. Все это могло являться как адаптивной реакцией на стрессоры, так и следствием уменьшения линейных размеров клеток эпидермы и более тесного их расположения. Последнее может быть связано с нарушением ростовых процессов растительных тканей под влиянием высоких доз загрязняющих веществ. Так, например, у ряски отмечено наиболее сильное увеличение размеров клеток, что, по мнению автора, являлось следствием поступления внутрь клеток листецов избыточного количества поллютантов непосредственно из водной среды. При этом, по мнению автора, инактивация поллютантов происходила как за счет различных хелатирующих агентов, так и путем разбавления концентрации загрязнителей в большем объеме биомассы (Капитонова, 2002). В работе Н.В. Чукиной с соавт. (2009) было исследовано влияние загрязнения среды обитания на мезоструктуру у семи видов макрофитов: *Elodea canadensis*, *Potamogeton perfoliatus*, *Potamogeton crispus*, *Potamogeton alpinus*, *Batrachium trichophyllum*, *Ceratophyllum demersum* и *Lemna gibba*. Было обнаружено, что

растения из более загрязненных местообитаний достоверно отличались более значительными размерами клеток мезофилла листа.

Следует отметить, что эффект увеличения размеров клеток был обнаружен и в наших исследованиях. В частности, при инкубировании *Egeria densa* в течение двух месяцев в среде с различными концентрациями гидрохинона и резорцина происходило увеличение площади поверхности и объема клеток в листьях испытуемых растений. Небольшие значения указанных параметров были отмечены при концентрациях гидрохинона 1 и 10 мг/л. Резорцин приводил к увеличению площади поверхности и объема клеток, но уже при меньшей концентрации – 0,1 мг/л (Кислицина, Борисова, 2012).

Действие ФС приводит не только к изменению количественных характеристик клеток, но при определенных концентрациях ФС оказывают серьезное воздействие на органеллы. Известно, что под действием токсикантов, в том числе фенольной природы, размеры вакуолей значительно увеличиваются. Кроме интенсификации процесса вакуолизации, часто наблюдается слияние вакуолей малых размеров и образование из них более крупных органелл, которые занимают большое внутриклеточное пространство растительной клетки. Процесс депонирования экзогенных фенолов в вакуолях позволяет клетке существенно уменьшить токсический эффект ФС (Квеситадзе и др., 2005). Следует отметить, что в вакуолях складываются частично преобразованные ФС (Tront, 2009). Чаще всего они являются конъюгатами ФС или промежуточными продуктами их превращений с эндогенными соединениями (белками, пептидами, аминокислотами, низкомолекулярными сахарами и т.д.) (Ensley et al., 1994, 1997; Roy, Hanninen, 1994; Barber et al., 1995; Sharma et al., 1997; Day, 2002; Квеситадзе и др., 2005). В то же время поступления в вакуоль нетрансформированных ФС не обнаружено (Стом, 1982). Например, после инкубации *Lemna gibba* и *Lemna minor* на растворах монофенола, 2,4-ДХФ и 2,4,5-ТХФ в листецах рясок в качестве основного продукта были обнаружены



конъюгаты с  $\beta$ -глюкозидами метаболитов исходных веществ (Ensley et al., 1994; Barber et al., 1995; Ensley et al., 1997; Sharma et al., 1997). Предполагается, что образованные конъюгаты депонируются в вакуолях (Tront, 2009). В исследованиях S. Roy и O. Hanninen (1994) было обнаружено, что метаболитические продукты ПХФ могут связываться с катехином в растениях *Eichhornia crassipes*. Было показано, что метаболитические продукты экзогенных фенолов не обязательно депонируются в вакуолях – они могут обнаруживаться также в составе лигнина или других биополимеров клеточных стенок (Schafer, Sandermann, 1988). Например, в исследованиях J.A. Day (2002) обнаружено, что метаболитические продукты 2,4,5-ТХФ способны связываться с апиозой – редким углеводом, имеющимся в клеточных стенках *Lemna minor*.

Показано, что при повышении уровня загрязнения среды, в том числе при действии ФС, содержание хлоропластов и фотосинтетических пигментов в водных макрофитах способно изменяться в весьма широких пределах (Чукина и др., 2009; Кислицина, Борисова, 2013). Так например, при инкубировании *Egeria densa* в течение двух месяцев на среде с гидрохиноном и резорцином в конце эксперимента было обнаружено возрастание количества хлоропластов в листьях элодеи по сравнению с вариантами без ФС (Кислицина, Борисова, 2013). Через 48 часов инкубирования *Egeria densa* в среде с гидрохиноном и резорцином при концентрации 1 мг/л обнаруживалось увеличение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, а также значительное снижение содержания хлорофилла *b* (неопубликованные данные автора). Следует отметить, что аналогичная реакция изменения содержания зеленых пигментов и каротиноидов под воздействием токсичных веществ, в том числе фенольной природы, была обнаружена и в других исследованиях (Чукина, 2010; Винокурова, 2015).

В исследовании по изучению влияния ФС на фотосинтетическую ассимиляцию  $^{14}\text{CO}_2$  *Draparnaldiella pilosa* было установлено, что минимальные концентрации дифенолов, *n*-бензохинона и монофенолов

( $10^{-6}$ М) практически не действуют на фотосинтез и в ряде случаев вызывают стимулирование фотосинтеза. С увеличением концентрации фенолов их токсическое действие усиливается, и наиболее ярко оно проявляется в случае гидрохинона и *n*-бензохинона. Концентрации  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ М этих соединений вызывают практически полное снижение фотосинтетической ассимиляции  $^{14}\text{CO}_2$ . Так, гидрохинон и *n*-бензохинон в  $10^{-3}$ М концентрации ингибируют фотосинтез драпарнальдиеллы на  $99,4 \pm 0,3\%$ , тогда как пирокатехин – на  $68,8 \pm 6,6\%$ . Резорцин мало токсичен, напротив, в его присутствии отмечено стимулирование фотосинтеза (Тимофеева и др., 1981).

Очень часто в растительных клетках под воздействием токсичных соединений увеличивается количество рибосом, что, очевидно, связано с усилением процесса биосинтеза белков (Zaalishvili et al., 2002). В частности, *o*- и *n*-ФС в процессе окисления образуют хиноны, способные блокировать сульфгидрильные группы белков, в том числе и SH-зависимых ферментов (Stom, 1977; Кирсо и др., 1988). Усиление биосинтеза белков в данном случае должно способствовать, с одной стороны, сбалансированию дефицита белков, израсходованных во время их конъюгации с токсичными соединениями и их метаболитами, а с другой – способствовать индукции ферментов, участвующих в детоксикационных процессах (Квеситадзе и др., 2005). Гистохимическими и биохимическими анализами установлено, что в это время происходит индукция таких важных для детоксикации ферментов, как пероксидазы, цитохром P<sub>450</sub>-содержащие монооксигеназы, фенолоксидазы. Содержание этих оксидаз значительно (иногда на порядок) увеличивается в клеточной стенке, на мембранах плазмалеммы, мембранах эндоплазматического ретикулума, тонопластов и в вакуолях, т.е. создаются условия, способствующие обезвреживанию токсикантов (Kvesitadze et al., 2001).

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о влиянии ФС на структуру клеток водных макрофитов, что отражается на размерах основных структурных элементов, их количестве, соотношении,

составе. Структурные изменения клеток водных макрофитов можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию, направленную на повышение устойчивости к действию ФС.

### **1.6. Роль низкомолекулярных антиоксидантов в формировании устойчивости водных макрофитов к экзогенным фенолам**

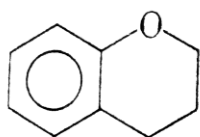
Водные макрофиты, как и другие растительные организмы, адаптируясь к изменяющимся условиям среды, в ходе эволюции выработали защитные механизмы, снижающие повреждающий эффект токсичных соединений, способных проникать в их клетки.

В частности, в клетках водных макрофитов присутствуют антиоксиданты, с помощью которых АФК, образовавшиеся в результате токсического действия ФС, эффективно ликвидируются. К важнейшим АО относят ферменты-антиоксиданты, а также низкомолекулярные соединения, такие как флавоноиды, аскорбиновая кислота, пролин, глутатион и др.

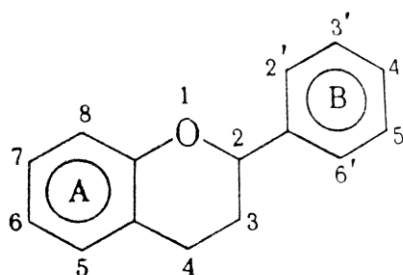
Поскольку спектр защитных реакций макрофитов очень широк, приведем характеристику тех АО, роль которых была изучена автором при проведении экспериментальной части работы.

#### ***Роль флавоноидов***

Флавоноиды представляют собой наиболее многочисленную группу природных фенольных соединений. Они принадлежат к соединениям С<sub>6</sub>-С<sub>3</sub>-С<sub>6</sub>-ряда, т.е. в их молекулах имеется два бензольных ядра (А и В), соединенных друг с другом трехуглеродным фрагментом. Большинство флавоноидов рассматривают как производные хромана или флавана:



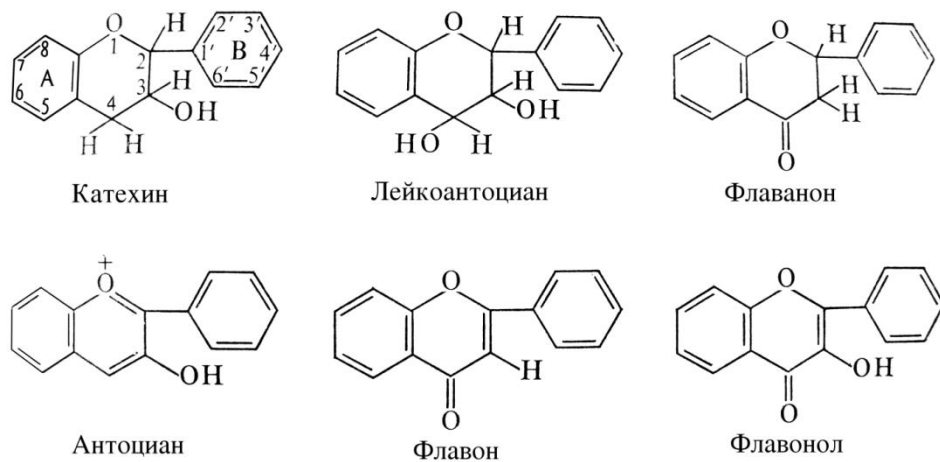
Хроман



Флаван (2 - фенилхроман)

Наиболее общепринятая классификация флавоноидов предусматривает их деление на 10 основных классов, исходя из степени окисленности (или восстановленности) трехуглеродного фрагмента: катехины (флаван-3-олы), лейкоантоцианидины (флаван-3,4-диолы), флаваноны, дигидрохалконы, халконы, антоцианидины, флаванолы (дигидрофлаванолы), флавоны, флавонолы и ауроны (Запрометов, 1993).

Наиболее часто встречающиеся в природе флавоноиды представлены ниже. Все они являются хорошо растворимыми в воде соединениями.



Разнообразие флавоноидов достигается за счет различного замещения в кольцах А и В (в разных положениях могут присоединяться группы  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$ ), наличия асимметричных атомов углерода (у катехинов, лейкоантоцианов и флаванонов), а также способности большинства из них образовывать гликозиды с широким набором моно-, ди- и даже трисахаридов (Кретович, 1980).

Синтез ФС происходит в хлоропластах и цитозоле. К настоящему времени известно два пути образования ФС – шикиматный и ацетатно-малонатный.

Основным является шикиматный путь, это практически единственный способ формирования ароматического кольца. Ацетатно-малонатный путь синтеза ФС широко распространен у грибов, лишайников и микроорганизмов. У растений он встречается реже. В структуре флавоноидов кольцо В формируется по шикиматному пути, тогда как кольцо А – по

ацетатно-малонатному. В клетке работают два шикиматных пути синтеза флавоноидов – один в пластидах, другой – в цитозоле. В этих компартментах находится полный набор изоферментов шикиматного пути, а также ферментов фенольного метаболизма. Таким образом, в растительной клетке функционируют две параллельные цепочки синтеза ФС (Запрометов, 1993).

Будучи постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, флавоноиды несут значительную функциональную нагрузку (Кретович, 1980; Бриттон, 1986):

- участвуют в процессах дыхания и онтогенеза;
- играют важную роль в окислительно-восстановительных и защитных реакциях;
- защищают растительные ткани от избыточной солнечной радиации;
- влияют на проницаемость мембран;
- являются субстратами ряда ферментов;
- выполняют антиоксидантную функцию.

Защитная роль флавоноидов, как правило, выражается в повышении их биосинтеза в растительных тканях в ответ на воздействие на растение неблагоприятных факторов. Полагают, что механизм действия флавоноидов заключается в следующем: они способны отдавать атом водорода из ОН-группы ароматического кольца для тушения и ликвидации свободных радикалов, окисляющих липиды и другие биомолекулы (Кретович, 1980).

Кроме того, обнаружена способность флавоноидов водных макрофитов принимать участие в обезвреживании экзогенных фенолов путем образования с ними конъюгатов (Roy, Hanninen, 1994).

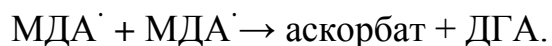
### ***Роль аскорбиновой кислоты***

Аскорбиновая кислота играет основную роль в ликвидации  $H_2O_2$  и, возможно, является наиболее важным и мощным антиоксидантом в растениях (Gill, Tuteja, 2010; Arora et al., 2002). Антиоксидантные функции аскорбиновой кислоты обусловлены тем, что она является потенциальным донором атомов водорода или электронов, используемых для восстановления

$\text{H}_2\text{O}_2$ , или некоторых свободнорадикальных продуктов. В ходе этих реакций аскорбиновая кислота может потерять один или два атома водорода с образованием монодегидроаскорбат-радикала (МДА) или дегидроаскорбата (ДГА):



Окисление аскорбиновой кислоты с образованием МДА может быть результатом прямых контактов с АФК, а также ферментативных реакций. Будучи нестабильным радикалом, МДА быстро переходит в ДГА. Так, две молекулы МДА, взаимодействуя друг с другом в реакции дисмутации, дают аскорбат и ДГА:



Как восстановитель, аскорбиновая кислота участвует в функционировании многих антиоксидантных систем, действующих в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитозоле и апопласте (Полесская, 2007).

### ***Роль пролина***

Аккумуляция пролина в растительных клетках показана при действии многих стрессовых факторов: тяжелых металлов (Шевякова и др., 1993; Кузнецов, Шевякова, 1999; Сакарийаво и др., 2001), холода (Трунова, 2007; Синькевич и др., 2009), засухи (Шевякова и др., 1993; Кузнецов, Шевякова, 1999; Сакарийаво и др., 2001), ультрафиолета (Радюкина и др., 2008). Известно, что пролин является одним из наиболее многофункциональных стрессовых метаболитов растений. В настоящее время считается, что помимо давно установленной осмопротекторной функции, пролин выполняет шаперонную, антиоксидантную, сигнально-регуляторную и другие функции (Szabados, Savoure, 2009; Carvalho et al., 2013). При неблагоприятных условиях среды пролин помогает растениям адаптироваться, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие клеточные компоненты (Кузнецов, Дмитриева, 2005; Холодова и др., 2005). Имеются сведения о том,

что остатки пролина в протеиновой цепочке способны создавать специфические участки для связей преимущественно с фенольными кольцами (Макаренко, Левицкий, 2012), что повышает значимость пролина при формировании устойчивости растений к действию ФС.

Антиоксидантная роль пролина заключается в его способности «тушить» синглетный кислород и гидроксил радикал (Smirnoff, Cubmes, 1989; Saradhi, Mohanty, 1993) Примечательно, что среди метаболитов, аккумулирующихся в растениях при стрессах, только для пролина показан эффект «тушения» синглетного кислорода в первые часы действия стрессора.

### ***Роль каротиноидов***

Каротиноиды – обязательные компоненты пигментных систем всех фотосинтезирующих организмов, представленные 3 группами соединений: каротинами, ксантофиллами и каротиноидными кислотами. Они принимают участие в поглощении света в качестве дополнительных пигментов и защищают молекулы хлорофиллов от необратимого фотоокисления (Полевой, 1989). Во многих исследованиях развиваются представления, придающие важную роль каротиноидам как антиоксидантам (Miller et al., 1996) и фотопротекторам, влияющим на перенос электронов в электронтранспортной цепи (Бухов, 2004). Каротиноиды реакционного центра (РЦ) и светособирающего комплекса (ССК) фотосистемы 2 (ФС2) могут обезвреживать хлорофилл в триплетном состоянии (Siefertmann-Harms, 1987). Имеются данные, что  $\beta$ -каротин, связанный с РЦ, защищает белок D1 кислородвыделяющего центра ФС2 от синглетного кислорода (Tefler et al., 1994). Возможно также прямое тушение возбужденного состояния синглетного хлорофилла а, сопровождающееся тепловой диссипацией (Horton et al., 1996). В этом процессе задействованы пигменты виолаксантинового цикла (Demmig-Adams, 1990).

Таким образом, к настоящему времени достаточно обстоятельно изучены биохимические особенности и физиологические функции таких низкомолекулярных антиоксидантов как флавоноиды, аскорбиновая кислота,

пролин, каротиноиды и др. Однако однонаправленных тенденций в изменении их содержания в клетках растений под действием окислительного стресса не выявлено, поскольку ответные реакции фитобионтов зависят от многих факторов: вида растения; фазы онтогенеза; вида поллютанта и его концентрации; взаимного действия разных поллютантов и других. В литературе практически отсутствуют данные об изменении содержания этих антиоксидантов при действии экзогенных ФС.

В целом анализ литературных данных показывает, что на современном этапе развития науки достаточно полно изучены процессы поглощения ФС водными макрофитами, выявлены механизмы фитотоксичности экзогенных фенолов, доказана возможность их трансформации в растительных клетках при участии *o*-дифенолоксидазы и пероксидаз.

Однако воздействие экзогенных фенолов на анатомо-морфологические параметры высших водных растений изучено слабо. Информация об изменениях мезоструктуры фотосинтетического аппарата водных растений под влиянием экзогенных ФС носит фрагментарный характер и получена в основном на водорослях. Защитные физиолого-биохимические механизмы, обуславливающие устойчивость водных макрофитов к действию экзогенных фенолов, почти не исследованы; практически не изучена защитная роль низкомолекулярных антиоксидантов при действии экзогенных ФС.

Как известно, загрязнение большинства водных объектов носит комплексный характер. Однако остаются открытыми вопросы об эффектах совместного влияния экзогенных фенолов на высшие водные растения. Практически отсутствуют сведения о совместном влиянии ФС и ТМ.

Все это и предопределило постановку задач исследования, направленного на выявление основных морфофизиологических реакций высших водных растений, обуславливающих их адаптационные возможности и устойчивость к действию экзогенных ФС.



## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика района исследований

Территория Свердловской области характеризуется сложной экологической обстановкой, поскольку первое место среди санитарно-гигиенических факторов формирования здоровья населения в течение последних лет стабильно занимает комплексная химическая нагрузка, которой подвержено 76,4% населения области (Государственный доклад..., 2014).

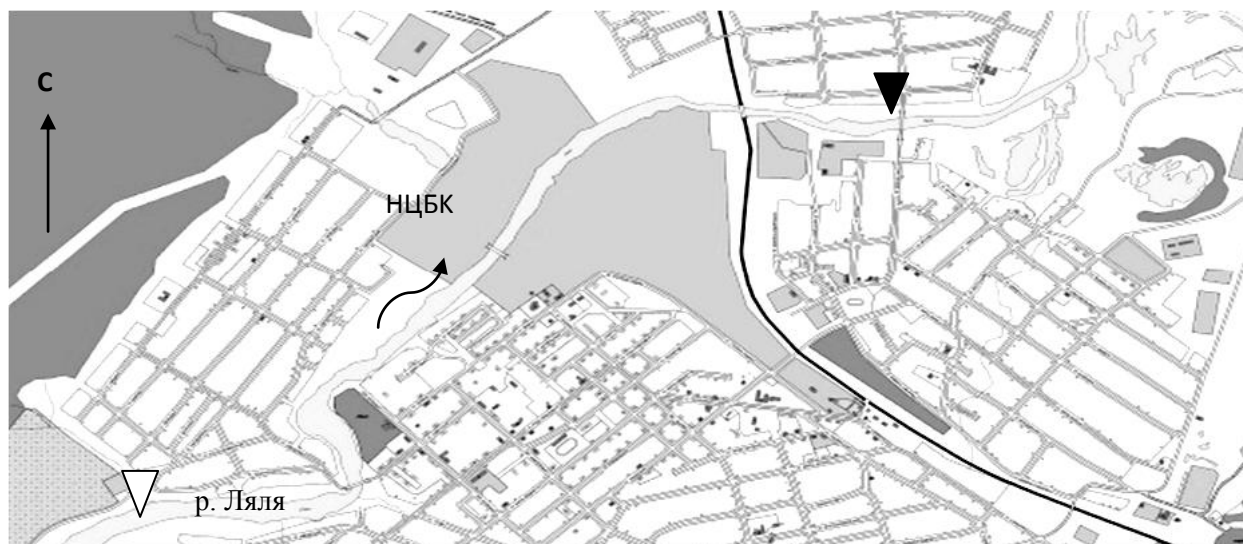
На современном этапе качество воды большинства водных объектов Свердловской области не отвечает нормативным требованиям (Доклад об экологической ситуации..., 2011). В целом в реках Свердловской области отмечена устойчивая загрязненность воды азотом нитритов (повторяемость превышений ПДК в целом по области составила 43%), сульфатами (31%), нефтепродуктами (41%), фенолами (33%), неустойчивая загрязненность азотом аммония (28%), фосфатами (19%), никелем (24%) и единичная загрязненность азотом нитратов (2%), фторидами (2%), мышьяком (1%) (Государственный доклад..., 2014).

Остановимся на характеристике водных объектов, из которых проводился отбор водных макрофитов.

Река Ляля – правый приток р. Сосьвы. Ляля берет начало на восточном склоне горы Лялинский камень (851 м. н. у. м.). Общая длина реки составляет 300 км, глубина от метра до трех, имеется множество стариц, перекатов. Основные притоки Ляли – Мурзинка, Отва, Черная, Лобва, Яборковка, Чумкостная. Река характеризуется высоким уровнем фенольного загрязнения на участке русла ниже производственных стоков Новолялинского целлюлозно-бумажного комбината (НЦБК). В 2013 году среднегодовая концентрация фенолов составила 23,4 ПДК (как и средняя кратность превышений ПДК), максимальная концентрация соответствовала экстремально высокому загрязнению и составила 51 ПДК (максимальная на территории Свердловской области), повторяемость превышений ПДК

фенолов в этом створе соответствовала 100 % (Государственный доклад..., 2014).

Отбор водных макрофитов в р. Ляля производили выше ( $59^{\circ} 02' \text{ с.ш. } 60^{\circ} 33' \text{ в.д.}$ ) и ниже ( $59^{\circ} 03' \text{ с.ш. } 60^{\circ} 36' \text{ в.д.}$ ) производственных стоков НЦБК (рис. 8).



**Рис. 8. Картосхема района сбора растительного материала из р. Ляля**

▽ – Фоновый участок ( $59^{\circ} 02' \text{ с.ш. } 60^{\circ} 33' \text{ в.д.}$ )

▼ – Импактный участок ( $59^{\circ} 03' \text{ с.ш. } 60^{\circ} 36' \text{ в.д.}$ )

Река Ляля выше города Новая Ляля согласно классификации качества воды водных объектов по значению удельного комбинаторного индекса оценивается как «очень загрязненная» и соответствует 3 классу качества разряда Б. Ниже г. Новая Ляля качество воды ухудшается до «грязной» 4 класса, разряда А (Доклад об экологической ситуации..., 2012). Основные химические характеристики воды из р. Ляля и сточных вод НЦБК представлены в таблице 4.

Река Сысерть – правый приток реки Исети. Образуется от слияния двух рек: Северная Сысерть и Полдневая Сысерть. Полдневая Сысерть начинается из небольшого озера Сысертского в заболоченной местности на границе Свердловской и Челябинской областей (Архипова, 1981). Длина р. Сысерть 76 км, площадь бассейна  $1250 \text{ км}^2$  (Доклад об экологической ситуации..., 2012). Рельеф реки в северной части Каслинско-Сысертского хребта горный,

Таблица 4

Основные характеристики воды из р. Ляля и сточных вод комбината по данным химической лаборатории НЦБК за  
апрель 2013 г.

Наименование стока	Температура в град.	pH	Цветность в град.	Прозрачность в см	Запах в баллах	Окисляемость мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	БПК 5 мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	БПК 20 мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	ХПК мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	Растворенный O <sub>2</sub> мг/дм <sup>3</sup>	Сухой остаток мг/дм <sup>3</sup>	Взвешенные вещества мг/дм <sup>3</sup>	Сульфаты мг/дм <sup>3</sup>	Железо мг/дм <sup>3</sup>	Нефтепродукты мг/дм <sup>3</sup>	Фенолы мг/дм <sup>3</sup>	СПАВ мг/дм <sup>3</sup>	Фосфаты мг/дм <sup>3</sup>	Азот аммонийный мг/дм <sup>3</sup>	Нитриды мг/дм <sup>3</sup>	Нитраты мг/дм <sup>3</sup>	Хлориды мг/дм <sup>3</sup>
р. Ляля Питьевой водозабор	6,6	7,5	86	29,0	0	6,67	2,07	3,36	14,36	8,40	114,8	3,6	11,1	0,7	0,105	Не обнаружены	0,02	0,019	0,457	0,021	0,921	2,11
р. Ляля Технический водозабор	6,6	7,5	92	29,0	0	6,88	2,16	3,42	15,24	8,42	116,7	3,7	11,4	0,7	0,109	0,002	0,02	0,019	0,459	0,020	0,924	2,15
р. Ляля ниже промстоков	7,1	8,3	180	24,0	1	22,01	12,62	16,34	43,71	8,96	194,9	9,0	19,03	0,824	0,232	0,010	0,07	0,028	0,666	0,035	1,191	3,01
р. Ляля ниже всех сбросов	7,1	8,2	160	25,0	1	18,63	10,41	13,78	39,21	8,86	152,7	7,4	16,41	0,795	0,207	-	0,07	0,028	0,698	0,038	1,207	3,03
Промстоки	Входящая вода	13,8	9,1	316	3,7	3,0	-	94,3	246,3	-	319,9	87,3	42,07	0,513	0,422	0,054	-	0,021	0,906	0,011	-	4,54
	Выходящая вода	-	8,8	325	6,1	2,6	-	88,5	109,5	241,4	-	369,8	17,17	43,19	0,463	0,408	0,052	-	0,019	0,866	0,012	-

Примечание: прочерк – отсутствие данных

далее переходит в равнинный. Основные притоки Сысерти – Северная Сысерть, Черная, Габиевка, Каменка (Архипова, 1981). Превышения ПДК по фенолам в р. Сысерть не обнаружено.

Отбор водных макрофитов в р. Сысерть производили в районе г. Двуреченск ( $56^{\circ} 36' \text{ с.ш. } 61^{\circ} 05' \text{ в.д.}$ ) (рис. 9) и вблизи территории биологической станции УрФУ ( $56^{\circ} 35' \text{ с.ш. } 61^{\circ} 03' \text{ в.д.}$ ) (рис. 10).



▼  $56^{\circ} 36' \text{ с.ш. } 61^{\circ} 05' \text{ в.д.}$

**Рис. 9. Картограмма района сбора растительного материала из р. Сысерть (в районе г. Двуреченск)**



▼  $56^{\circ} 35' \text{ с.ш. } 61^{\circ} 03' \text{ в.д.}$

**Рис. 10. Картограмма района сбора растительного материала из р. Сысерть (в районе биологической станции УрФУ)**

Выбор точек отбора растительного материала обусловлен их транспортной доступностью, наличием доминантных видов, а также

присутствием или отсутствием фенольного загрязнения в пределах исследуемых участков.

## 2.2. Характеристика исследованных макрофитов

Объектами изучения были следующие виды водных макрофитов: *Elodea canadensis* Michx. (элодея канадская), *Egeria densa* Planch. (эгерия густолиственная), *Potamogeton crispus* L. (рдест курчавый), *Potamogeton alpinus* Balb. (рдест альпийский), *Potamogeton perfoliatus* L. (рдест пронзеннолистный), *Lemna gibba* L. (ряска горбатая), *Lemna minor* L. (ряска маленькая), *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch (шелковник волосистый), *Sagittaria natans* Pall. (стрелолист плавающий), *Sagittaria sagittifolia* L. (стрелолист обыкновенный), *Alisma plantago-aquatica* L. (частуха подорожниковая), *Sparganium emersum* Rehm. (ежеголовник всплывший).

Все растения, за исключением *E. densa* и *L. minor*, были взяты из природных местообитаний. Эксперименты с *E. densa* и *L. minor* выполнены на растениях, выращенных в аквакультуре. Среди исследованных макрофитов не все виды относились к группе гидрофитов, или настоящих водных растений. В частности, присутствовали и прибрежно-водные растения, у которых имеется водная форма: *Sagittaria sagittifolia*, *Alisma plantago-aquatica*, *Sparganium emersum*. Для анализа показателей в данном случае использовали только плавающие листья растений.

Ниже представлена краткая характеристика исследованных видов растений. Приводятся латинские и русские названия, жизненные формы, морфологические признаки, местообитание и географическое распространение.

### Отдел **MAGNOLIOPHYTA** – ЦВЕТКОВЫЕ РАСТЕНИЯ

#### Класс **LILIOPSIDA** – ОДНОДОЛЬНЫЕ

#### Сем. **HYDROCHARITACEAE** – ВОДОКРАСОВЫЕ

##### 1) *Elodea canadensis* Michx. Элодея канадская

Многолетнее травянистое растение, с погруженными в воду длинными ветвистыми стеблями (Новиков, 2002). Листья собраны по 2–3 в мутовке,

продолговато-яйцевидные или линейно-ланцетные. Цветки одиночные в пазухах листьев, обоеполые или однополые. Пестичные цветки на длинных цветоножках во время цветения достигают поверхности воды. Тычиночные с 3 тычинками. Чашелистиков и лепестков по 3. Родина растения – Северная Америка (Определитель растений..., 2006). Быстро распространившись, вид захватил огромную территорию. В России широко распространен в Европейской части, изредка встречается на юге Сибири. Растет в стоячих и медленно текущих водах, прудах, речных заводях, старицах, каналах (Новиков, 2002).

## 2) *Egeria densa* Planch. Эгерия густолиственная

Погруженный в воду, заносный многолетний макрофит, растущий в водных объектах 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 (Tront, 2007). Тычиночные цветки белые, одиночные. Пестичные цветки не найдены, поэтому семенное размножение невозможно. Размножается вегетативно – фрагментами стеблей. Естественная среда обитания – Южная Америка в пределах Бразилии, Аргентины и Уругвая (Cook, 1984). К настоящему времени элодея густолиственная натурализовалась в естественных водоемах на всех континентах, кроме Антарктиды, включая Евразию (Бялт, Орлова, 2003; Распопов, 2011). Растение распространилось по водным объектам всего мира: находки элодеи густолиственной в естественных водоемах простираются от Новой Зеландии и Чили (39°97' ю. ш.) до Исландии (63°97' с. ш.) (Cook, 1984; Yarrow, 2009).

## Сем. *POTAMOGETONACEAE* – РДЕСТОВЫЕ

### 3) *Potamogeton crispus* L. Рдест курчавый

Многолетнее растение с характерными листьями: все они подводные, полупрозрачные, по краю волнистые или курчавые (Новиков, 2002), линейно или удлинено-продолговатые, к верхушке туповатые либо коротко-заостренные, 2–7 см длиной, 0,5–1 см шириной (Определитель растений...,

2006). В пазухах листьев развиты два кожистых, опадающих прилистника, на конце выемчатые, 3–5 см длиной и 1 см шириной. Цветоносы 2–3 см длиной. Соцветие – малоцветковый колос. Околоцветник отсутствует. Тычинок и пестиков по 4. Плоды – мелкие орешкообразные нерастрескивающие костянки с крючковидно изогнутым носиком, равным длине плода. Произрастает в стоячих и медленно текущих водах на глубине 0,1–3,5 м (Красная книга..., 2010), озерах, пойменных водоемах, прудах (Новиков, 2002).

#### 4) *Potamogeton alpinus* Balb. Рдест альпийский

Многолетнее погруженное в воду растение с удлиненным стеблем до 150 см длиной. Стебель простой, красноватый в верхней части. Листья при высыхании также краснеющие, цельнокрайние, с туповатой верхушкой, 7–15 см длиной, 4–13 мм шириной. Прилистники рано опадающие. Цветоносы не утолщены. Плодики с килеватой спинкой, обратнойцевидные. Растет в реках, протоках, прудах (Определитель растений..., 2006).

#### 5) *Potamogeton perfoliatus* L. Рдест пронзеннолистный

Многолетнее погруженное в воду растение с удлиненным стеблем до 100 см длиной. Листья с сердцевидным основанием, округло-яйцевидные, овальные, яйцевидно-ланцетные, 1,5–7 см длиной, 1,3–3,5 см шириной, на верхушке тупые, иногда заостренные. Толстых жилок 3–5, между ними несколько более тонких. Прилистники короткие, нежные, беловатые, рано опадающие. Цветоносы до 7 см длиной. Растет в реках, озерах, прудах (Определитель растений..., 2006).

### Сем. *ARACEAE*– АРОИДНЫЕ

#### 6) *Lemna gibba* L. Ряска горбатая

Многолетнее водное растение. Листецы (фронды) – листовидные стебли, плавающие на поверхности воды, – округлые или овальные, 5–7 мм длиной, с нижней стороны выпуклые и имеют заполненные воздухом полости, видные на поперечном срезе, сверху плоские, без жилок, обычно одиночные, зеленые и иногда красноватые снизу и по краям. Цветет в июне –

августе. Плоды созревают редко. Размножается вегетативно – молодыми стеблями, отделяющимися от материнского растения.

Распространена в Европе, Западной и Южной Азии, Африке, Северной и Южной Америке. Постепенно расселяется по территории России. Обитает в водоемах, карьерах, канавах (Губанов и др., 2002).

### **7) *Lemna minor* L. Ряска маленькая**

Многолетнее водное растение. Листецы эллиптической формы, 3–4,5 мм длиной и 2–3 мм шириной. За счет ветвления образуют группы из 3–6 побегов. При основании стебля имеется боковой кармашек, в котором может развиваться соцветие, состоящее из двух тычиночных и одного пестичного цветков. Цветет в мае–июне, но не регулярно. Плоды созревают редко. Размножается вегетативно – молодыми стеблями, отделяющимися от материнского растения. Широко распространена в Евразии, Северной Африке, Северной Америке, Австралии. В России – во многих районах европейской части, в южной половине Сибири и Дальнего Востока. Обитает в водоемах со стоячей и медленно текущей водой (Губанов и др., 2002).

## **Сем. *ALISMATACEAE* – ЧАСТУХОВЫЕ**

### **8) *Sagittaria natans* Pall. Стрелолист плавающий**

Многолетний укореняющийся гидрофит с плавающими на воде листьями (Распопов и др., 2011). Воздушные листья с короткими лопастями, плавающие – без лопастей или с очень короткими лопастями. Стебель погружен в воду. Пыльники желтые (Определитель растений..., 2006). Цветочные стрелки длиннее листьев, соцветие состоит из двух зонтиковидных мутовок: нижней с пестичными цветками, верхней с тычиночными. Цветки чисто-белые. Плодики мелкие, 2,5–3,5 мм длиной, с относительно узким крылом, многочисленные, на сильновыпуклом цветоложе. Цветет в июле – августе. Плодоносит в августе – сентябре. Обитает в прибрежной зоне озер, стариц, рек с медленным течением, канавах на глубине до 1 м. Внесен в Красные книги Восточной



Фенноскандии, Архангельской, Ленинградской и Тверской областей (Красная книга..., 2004).

### **9) *Sagittaria sagittifolia* L. Стрелолист обыкновенный**

Многолетнее прибрежно-водное растение с укороченным корневищем. Имеет удлиненные подземные побеги, осенью образующие клубневидные утолщения на верхушке. Стебель высотой 20–100 см, трехгранный, простой или слабоветвистый, с прикорневыми листьями и верхушечным соцветием. Листья трех типов: подводные сидячие, линейные, лентовидные, шириной 3–20 мм; плавающие – длинночерешковые с продолговато-эллиптической, яйцевидной или эллиптической пластинкой, длиной 3,5–14 см, шириной 2,5–7,5 мм; надводные (воздушные) – со стреловидно-треугольной пластинкой, длиной 6,5–15 см, шириной 100–120 мм. Цветы расположены по три мутовчато, в верхних мутовках тычиночные с многочисленными тычинками, в нижних – пестичные с многочисленными пестиками. Лепестки до 1,5 см длиной, обычно белые с фиолетовым ноготком. Пыльники фиолетовые, реже желтые. Плодики косо-обратнойцевидные, в диаметре 4–5,5 мм, с коротким прямым носиком. Цветет в июне–июле, плодоносит в июле–августе. Широко распространен в России в Европейской части. Растет в воде или по берегам водоемов с медленно текущей или стоячей водой, на болотах. Размножается и распространяется семенами и вегетативно (Губанов и др., 2002).

### **10) *Alisma plantago-aquatica* L. Частуха подорожниковая**

Многолетнее водно-болотное растение с утолщенным коротким корневищем. Стебель 10–70 см высотой, прямой, вверху ветвящийся. Все листья прикорневые, длинночерешковые, кроме самых нижних, с яйцевидной или овальной пластинкой, в основании сердцевидной или округлой, вверху заостренной или острой. Соцветие крупное, пирамидально-метельчатое. Цветки около 10 мм в диаметре, белые или бледно-розовые, раскрываются утром и остаются открытыми весь день. Тычинки вдвое длиннее пестиков; пыльники продолговатые, желтые. Стилodium прямой, длиннее завязи.

Плодики 2–3 мм длиной, на спинке неглубоко однобороздчатые, по бокам тонкокожистые. Семена гладкие. Цветет в июне–июле, плодоносит в июле–августе. Растет по берегам самых разнообразных водоемов, на сырых и заболоченных лугах, болотах, а также канавах и кюветах, придорожных сырых понижениях; часто в воде. Размножается и распространяется семенами (Губанов и др., 2002).

## **Сем. SPARGANIACEAE – ЕЖЕГОЛОВНИКОВЫЕ**

### **11) *Sparganium emersum* Rehm. Ежеголовник всплывший**

Водно-болотный многолетний вид. Стебель прямостоячий, реже плавающий, 30–50 см длиной. Листья 3–8 мм шириной, снизу с тупым килем, на поперечном срезе трехгранные. Соцветие простое, удлиненное, из 3–5 головок из тычиночных цветков и 4–6 из пестичных, верхние из которых сидячие, а нижние обычно на ножках, внепазушные. Тычинки длинные с линейными пыльниками до 2 мм длиной. Столбик при плодах прямой, 2–3 мм длиной; рыльце 1,5–2 мм длиной, узколинейное. Плоды зеленые, позднее коричневые, с перетяжкой в средней части, вверху постепенно заостренные, на ножке, 2–3 мм длиной. Цветет в июне–июле, семена созревают в июле–августе. Растет по берегам озер, заводей рек, в канавах и по болотам, обычно на мелководных участках, но иногда заходит на более глубокие места, образуя формы с плавающими стеблем и листьями. Размножается и распространяется семенами (Губанов и др., 2002).

## **Класс: MAGNOLIOPSIDA – ДВУДОЛЬНЫЕ**

## **Сем. RANUNCULACEAE – ЛЮТИКОВЫЕ**

### **12) *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch Шелковник волосистолистный**

Многолетнее растение с плавающими и погруженными нитевидномногогроздельными листьями. Листья на коротких черешках или сидячие, в очертании почковидные, трехкратно 3-раздельные, вне воды растопыренные. Стебли опушенные (Определитель растений..., 2006). Плод шелковника – многоорешек. Количество плодиков (орешков) в соплодии более 35. Средняя

длина орешка не превышает 2,0 мм, высота – около 1,5 мм. Зрелые плодики золотистого или светло-коричневого цвета с легким восковым налетом имеют яйцевидную форму, волнообразно скульптурированную с боков, и покрыты тонкими, отстоящими друг от друга волосками (Лебедева, Лапиров, 2013). Обитает в верховьях водохранилищ, прудах, старицах, болотных мочажинах со стоячей или слабо-проточной водой (Лисицына и др., 1993).

### **2.3. Методы исследований**

Задачи данной работы обусловили необходимость комплексного изучения водных макрофитов. Экспедиционные исследования позволили выявить встречаемость видов в импактном и условно чистом участках реки, произвести измерение морфометрических характеристик растений, а также осуществить сбор водных макрофитов для последующего изучения в лабораторных условиях. Модельные исследования дали возможность уточнить эффекты воздействия отдельных ФС, их сочетаний с другими фенолами и тяжелыми металлами. Использование моно- и дифенолов для модельных экспериментов обусловлено тем, что данные соединения являются доминирующими поллютантами сточных вод НЦБК. Ввиду того, что для ряда регионов Российской Федерации характерно многокомпонентное загрязнение, где ФС и ТМ являются доминирующими поллютантами были проведены эксперименты, по изучению их совместного действия.

Отбор растительного материала осуществляли в июне–июле 2008–2013 гг. в период активной вегетации макрофитов. Для избежания попадания в выборку гибридных форм отбирались растения из естественных местообитаний с четко определяющимися признаками. Видовую принадлежность водных макрофитов устанавливали по определителям (Губанов и др., 2002; Новиков, Губанов, 2002; Определитель растений..., 2006). Места взятия выборок характеризовались сходными экологическими условиями. Для сбора растительного материала были использованы средние

по величине растения. У растений, имеющих боковые побеги, использовали листья только из средней части основных побегов.

При определении морфофизиологических параметров растений анализировали зрелые листья макрофитов (листецы, или фронды у ряски). Достоверность полученных результатов определялась 10 биологическими и тремя аналитическими повторностями. В модельных экспериментах с ряской использовали по 30 фрондов для каждого варианта опыта.

Для выявления защитных реакций водных макрофитов, расширяющих их экологические границы жизни, были проведены модельные эксперименты на отдельных видах растений из природных местообитаний с разной степенью фенольного загрязнения.

В краткосрочных экспериментах (длительностью 24–96 ч) с целью выявления действия конкретных ФС на физиолого-биохимические параметры водных макрофитов использовали растворы отдельных фенолов, приготовленные на дистиллированной воде. Это обусловлено тем, что компоненты водопроводной воды способны взаимодействовать с фенолами, поэтому выделить влияние ФС в данном случае было бы затруднительно.

В долгосрочных экспериментах (длительностью 20–60 суток) для изучения изменений морфометрических параметров растений в ответ на действие ФС использовали отстаивную водопроводную воду. Это позволило наблюдать влияние ФС вкупе с другими компонентами среды, присутствующими в природных водах.

В экспериментах, направленных на выявление действия ФС на мезоструктуру листа, водные растения выращивали на среде Хогланда-Арнона в течение 2 месяцев. Для исследования мезоструктуры использовали только новые побеги, сформированные за время инкубации. Для формирования новых побегов требуется продолжительное время и достаточное минеральное питание, чем и обуславливается выбор питательной среды.

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 функционирование 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).

Для решения поставленных задач были использованы методы биохимического и анатомо-морфологического анализа, представленные ниже.

Всего было проанализировано и обработано в физиолого-биохимической части исследования 852 пробы.

**Активность о-дифенолоксидазы** определяли титриметрическим методом с использованием аскорбиновой кислоты (Починок, 1976) и пересчитывали на сухую массу. Для определения активности ДФО брали 1 г свежего растительного материала, растирали в фарфоровой ступке с дистиллированной водой, переносили в мерную колбу на 50 мл. Полученный раствор взбалтывали и, не давая осадку осесть, набирали 10 мл суспензии, которую выливали в колбу для титрования на 250 мл. Затем прибавляли 1 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,4, приливали 5 мл 0,04 н раствора аскорбиновой кислоты, перемешивали и прибавляли 5 мл 0,2%-ного раствора пирокатехина, одновременно включая секундомер и встряхивая раствор в течение 2 минут. Точно через 2 минуты реакцию прекращали добавлением 5 мл 5%-ного раствора метафосфорной кислоты. Необходимое количество кислоты отмеривали в чистую пробирку еще до начала опыта. Перед началом опыта все растворы были доведены до температуры 20° С погружением в воду с этой температурой. Остаток аскорбиновой кислоты определяли

титрованием 0,01 н раствором йодата калия в присутствии 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала до появления не исчезающей синей окраски. Одновременно проводили контрольное титрование. Для этого набирали 10 мл суспензии в колбу для титрования, прибавляли 5 мл метафосфорной кислоты, 5 мл 0,04 н раствора аскорбиновой кислоты и титровали 0,01 н раствором  $KJ_3$  в присутствии крахмала. В опытном и контрольном вариантах определения проводили трехкратно. На основании полученных данных вычисляли активность ДФО по следующей формуле:

$$A = \frac{50 \cdot 5 (a-b)}{10 \cdot n \cdot 2} = \frac{12,5(a-b)}{n}, \text{ где}$$

A – активность ДФО (в мкмоль окисленной за 1 мин при 20° С аскорбиновой кислоты на 1 г исследуемого вещества; 50 – общий объем суспензии исследуемой ткани, мл; 2 – время проведения реакции (в мин); a – объем 0,01 н. раствора  $KJ_3$ , затраченный на титрование контрольной пробы, мл; 5 – коэффициент для пересчета миллилитров 0,01 н раствора аскорбиновой кислоты в микромоли ( $\frac{0,00088}{0,000176} = 5$ ).

**Активность гваякол-специфичной пероксидазы** оценивали по скорости полимеризации гваякола до тетрагваякола, сопровождаемой увеличением оптической плотности реакционной среды при длине волны 470 нм. За основу принят метод В. Chance, А. Maehly (1955) с некоторыми модификациями (Методы оценки..., 2012). 0,5 г свежего растительного материала растирали в фарфоровой ступке со стеклянным песком на льду с 1,5–2 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,0–7,0). Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, обмывая ступку небольшим количеством буфера. Общий объем использованного буфера составлял 5 мл. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин (15 000 g при 4°С). Супернатант переносили в чистую, сухую пробирку, помещенную в стакан со льдом, для предотвращения потери активности. Супернатант использовали в качестве фермента и хранили в холодильнике не более 2 часов до проведения реакции. Активность ГП определяли в кюветах для СФ при температуре 30 °С. В

кювету (объемом 3 мл) приливали 3 мл реакционной среды. Реакционную среду готовили на 0,1 М фосфатном буфере при рН 6,8–7. На каждые 50 мл буфера использовали 51,5 мкл пероксида водорода 33% и 50 мкл гваякола. Реакцию запускали добавлением 0,05 мл супернатанта. Смесь быстро встряхивали и измеряли изменение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 470 нм каждые 10 секунд в течение 2 мин. В контрольную пробу вместо супернатанта добавляли равный объем буфера. Показания снимали аналогичным способом. В опытном и контрольном вариантах определения проводили трехкратно. Полученные данные использовали для расчета скорости падения максимума поглощения в интервале времени, соответствующем линейному участку кривой, при длине волны 470 нм ( $tg = \Delta D/t$ ). Для перехода от тригонометрической функции (тангенса) к абсолютным единицам активности фермента использовали формулу:

$$АГП = (tg_o - tg_k) \cdot V_{п} / 26,6 \cdot m,$$

где АГП – активность гваяколовой пероксидазы, мкМ гваякола/мг сырого вещества\*мин;

$tg_o - \Delta D / t$  для опытной пробы;

$tg_k - \Delta D / t$  для контрольной пробы;

$V_{пробы}$  – объем реакционной среды в пробе (3,05 мл);

26,6 – коэффициент экстинции гваякола,  $mM^{-1}cm^{-1}$ ;

$m$  – масса навески свежего растительного материала, мг.

Полученное значение активности ГП пересчитывали на сухую массу (на г сухого вещества).

**Содержание растворимого белка** в растительном материале определяли по методике Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976). 0,5 г свежего растительного материала растирали до образования однородной массы с 5 мл фосфатного буфера (рН 7,4) в фарфоровой ступке на холоду. Затем гомогенат центрифугировали 10 мин при 8 000 g. Супернатант использовали для

определения концентрации белка. 0,1 мл раствора супернатанта помещали в пробирки, прибавляли 5 мл реактива Кумасси (*Coomassi Brilliant Blue*), перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение одинакового времени, но не более 1 часа. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца брали аналогичный объем буфера с аналогичным объемом реактива Кумасси. Измерения проводили в трех аналитических повторностях. Содержание белка в пробе в мг/л определяли по калибровочному графику. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

**Содержание флавоноидов** определяли в спиртовой (96% этанол) вытяжке на спектрофотометре при длине волны 420 нм после проведения реакции, основанной на способности флавоноидов реагировать с лимоннокислым борным реактивом с образованием окрашенного комплекса (Рогожин, 2006). Для определения содержания флавоноидов готовили ряд растворов:

рабочий раствор 1 (PP1): в 700 мл 96%-ного этанола растворяли 7 мл тритона X-100;

раствор 20%-ной лимонной кислоты: 32,7 г лимонной кислоты растворяли в 150 мл PP1;

раствор 5%-ной борной кислоты: 7,5 г борной кислоты растворяли в 150 мл PP1;

рабочий раствор 2 (PP2): смешивали 1:1 раствор 20%-ной лимонной кислоты с раствором 5%-ной борной кислоты.

Для максимального извлечения флавоноидов из листьев растений использовали PP1. Сырые листья макрофитов измельчали и заливали PP1 в соотношении 1 : 5. Экстракцию флавоноидов проводили путем настаивания листьев в течение 24 ч. По истечении времени настаивания отмечали точный объем экстракта. В опытную пробирку вносили 0,1 мл экстракта и 3 мл PP2. Во вторую пробирку (контрольный раствор) вносили 0,1 мл экстракта и 3 мл



20%-го раствора лимонной кислоты. Оптическую плотность опытного и контрольного растворов измеряли через 15 мин на спектрофотометре при длине волны 420 нм. Величину оптической плотности опытной пробы вычисляли путем вычитания из оптической плотности опытной пробы (с РР2) оптической плотности супернатанта с 20%-м раствором лимонной кислоты.

Концентрацию флавоноидов определяли по калибровочному графику. Содержание флавоноидов в исследуемом образце вычисляли по формуле:

$$СФ = С \cdot V_1 \cdot V_3 / m \cdot V_2,$$

где СФ – содержание флавоноидов, мг/г сырого веса;

С – концентрация флавоноидов, определенная по калибровочному графику мг/мл;

$V_1$  – общий объем после экстракции, мл;

$V_2$  – объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл;

$V_3$  – конечный объем пробы в пробирке, мл.

$m$  – навеска растительного материала, г.

**Содержание водорастворимых АО** определяли спектрофотометрически после проведения реакции, основанной на способности АО реагировать с фенантролином с образованием окрашенного комплекса (Рогожин, 2006). Растительный материал (0,5 г сырых листьев) растирали в ступке с 1 мл 50%-го этанола с добавлением стеклянного песка. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, обмывая ступку несколько раз небольшим (0,5 мл) количеством этанола. Общий объем пробы составлял 3 мл. Центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g.

Для построения калибровочного графика использовали 2 ряда пробирок по 5 шт. в каждом. Первый ряд использовали для разбавления исходного раствора аскорбиновой кислоты с концентрацией 200 мкг/мл. Второй ряд пробирок служил для проведения качественной реакции.

После разбавления из каждой пробирки первого ряда отбирали по 0,2 мл калибровочного раствора и вносили последовательно в расположенные

напротив пробирки второго ряда. Затем во все пробирки второго ряда последовательно добавляли по 0,2 мл 25-го раствора *o*-фенантролина, 2,4 мл 96 %-го раствора этанола и по каплям приливали 0,2 мл раствора FeCl<sub>3</sub>. После перемешивания пробирки второго ряда выдерживали в темноте 10 мин (время проведения реакции). Реакцию останавливали добавлением 1 мл раствора HCl.

Контрольной служила пробирка, в которую добавляли по 0,2 мл раствора *o*-фенантролина, 2,6 мл 96%-го раствора этанола, 0,2 мл раствора FeCl<sub>3</sub> и 1 мл раствора HCl.

Измерение оптической плотности калибровочных растворов проводили при 505 нм.

Реакцию с опытными растворами проводили следующим образом. В опытную пробирку последовательно вносили 0,2 мл экстракта, 0,2 мл раствора *o*-фенантролина и по каплям приливали 0,2 мл раствора FeCl<sub>3</sub>. Затем объем доводили до 3 мл 96%-м раствором этанола, перемешивали и пробу выдерживали в темноте 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,4 М раствора HCl.

Контрольной служила пробирка, в которую добавляли по 0,2 мл раствора *o*-фенантролина, 2,6 мл 96%-го раствора этанола, 0,2 мл раствора FeCl<sub>3</sub> и 1 мл раствора HCl.

Если экстракт имел окраску, то в отдельную пробирку вносили объем экстракта, равный взятому для определения (0,2 мл), и затем доводили общий объем содержимого пробирки до 4 мл 96%-м раствором этанола. Оптическую плотность экстракта измеряли против раствора 96%-го этанола при 505 нм. Величину разности оптических плотностей опытной пробы и экстракта использовали для определения концентрации аскорбиновой кислоты по калибровочному графику. Содержание антиоксидантов (в расчете на аскорбиновую кислоту) в опытной пробе определяли по формуле:

$$AO = C \cdot V_1 \cdot V_3/m \cdot V_2 \cdot 1000,$$

где АО – содержание водорастворимых антиоксидантов, мг/г сырого веса;

$C$  – концентрация антиоксидантов, определенная по калибровочному графику, мкг/мл;

$m$  – навеска сырого растительного материала, г;

$V_1$  – объем, взятый для экстракции, мл;

$V_2$  – объем экстракта, вносимого в пробирку, мл;

$V_3$  – конечный объем пробы в пробирке, мл.

**Содержание аскорбиновой кислоты** определяли спектрофотометрически. За основу взят метод, разработанный Е.Д. Невитт с соавт (1961). Для определения содержания аскорбиновой кислоты готовили ряд растворов на дистиллированной воде:

а) метафосфорную кислоту – 2 г на 100 мл (2%-й раствор);

б)  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (М 164) – 33 г фосфата натрия растворяли в 100 мл.

Из полученных растворов готовили смесь метафосфорной кислоты и фосфата в соотношении 3 : 2.

Затем 0,5 г сырого растительного материала гомогенизировали с 3 мл 2%-го раствора метафосфорной кислоты. Гомогенат переносили в мерную пробирку и доводили смесью  $\text{HPO}_3$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , взятых в соотношении 3 : 2 (V/V, pH 7,3–7,4) до 10 мл. Экстракт центрифугировали 15 мин при 3 000 g. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при 265 нм против стандарта вышеуказанных растворов  $\text{HPO}_3$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , взятых в том же соотношении (3:2). Результаты вычисляли по формуле, используя коэффициент молярной экстинкции для аскорбиновой кислоты при 265 нм:

$$AK = (D_{265} \cdot V) / (1,655 \cdot 10^4 \cdot m),$$

где АК – содержание аскорбиновой кислоты, М аскорбата /г сырого веса;

$1,655 \cdot 10^4$  – коэффициент молярной экстинкции аскорбата, моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>;

$D_{265}$  – оптическая плотность опытного раствора при длине волны 265 нм;

$V$  – объем пробы общий, мл;

$m$  – навеска сырого растительного материала, г.

**Содержание свободного пролина** определяли спектрофотометрически. За основу взят метод L.S.Bates (1973) с некоторыми модификациями (Калинкина и др., 1990).

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива (30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 1,25 г нингидрина). 200 мг сырых листьев макрофитов помещали в пробирку, приливали 10 мл кипящей дистиллированной воды и на 10 минут помещали в кипящую водяную баню. Затем в чистую пробирку приливали 1 мл экстракта (отделенного от растительной ткани) и добавляли к нему 1 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл нингидринового реактива. После чего пробы инкубировали в течение 1 часа в кипящей водяной бане, затем быстро охлаждали во льду. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм. Значения содержания пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения пролин фирмы «Serva». Содержание пролина выражали в микромолях на 1 г сырой массы, после чего пересчитывали на 1 г сухой массы.

**Интенсивность ПОЛ** определяли по методу M. Uchiyama (Uchiyama, Mihara, 1978). Об изменении прооксидантного статуса макрофитов судили по содержанию соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС). В основе метода лежит их способность взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенного комплекса с максимумом поглощения при 535 нм.

0,5 г сырого растительного материала растирали со стеклянным песком в ступке с небольшим количеством (конечный объем 5 мл) 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Гомогенат фильтровали и помещали в пробирку 0,3 мл фильтрата, 3 мл раствора ортофосфорной кислоты, 1 мл раствора ТБК и 0,1 мл раствора  $\text{FeSO}_4$ . Опытные пробы помещали на водяную баню, нагретую до 95–100 °С. Через 1 час пробирки охлаждали в сосуде с холодной водой (10 °С) и приливали 4 мл н-бутанола. Затем центрифугировали 10 мин при 10000

г. После центрифугирования верхний слой бутанола с окрашенным экстрактом переносили в сухие пробирки для измерения оптической плотности. Оптическую плотность бутанольного экстракта измеряли против н-бутанола при длине волны 532 нм и 600 нм. Содержание ТБК-реагирующих соединений рассчитывали по формуле

$$\text{ТБКРС} = (D_{532} - D_{600}) \cdot 5 \cdot 4 / (155 \cdot 1000 \cdot 0,3 \cdot 0,5),$$

где ТБКРС – ТБК-реагирующие соединения, мМ/г сырого веса;

5 – конечный объем буфера, мл;

4 – объем бутанола, мл;

1000 – коэффициент перевода л в мл

0,3 – объем фильтрата, внесенного в реакционную смесь, мл;

155 – коэффициент экстинции ТБК,  $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ;

0,5 – навеска растительного материала, г.

Содержание ТБКРС выражали в мМ/г сырой массы, после чего пересчитывали в мМ/г сухой массы макрофитов.

**Мокрое озоление растительного материала** осуществляли в круглодонных колбах Кьельдаля. Сущность метода мокрого сжигания состоит в озолении органического материала при нагревании с концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в присутствии различных окислителей. При нагревании под действием  $\text{H}_2\text{SO}_4$  вся органика разлагается до  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  и  $\text{NH}_4^+$ . Ион аммония в кислой среде удерживается в растворе. Переходят в минеральную форму и все другие элементы озольемого материала. В подготовленном таким образом материале можно проводить определение общего азота, фосфора, калия и многих других минеральных элементов (Унифицированные методы..., 1973). Перед проведением озоления взвешивали на торсионных весах 200 мг сухих листьев макрофитов и помещали их в колбу Кьельдаля на 100 мл. К взятой навеске растительного материала приливали 5,5 мл смеси концентрированных  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{HClO}_4$  (в соотношении 10:1) и ставили на нагреватель. С появлением белых паров колбу снимали с нагревателя, несколько раз встряхивали и оставляли на 10–15 мин

в штативе. После пропитывания навески кислотой колбу снова ставили на нагреватель и продолжали сжигание до полного обесцвечивания жидкости в колбе. Обычно процесс занимал 15–20 мин. Затем колбу с минеральным содержимым охлаждали до комнатной температуры и приливали 20–30 мл воды. Колбу вторично охлаждали, после чего содержимое переливали в мерную колбу на 100 мл, споласкивая колбу Кьельдаля несколькими порциями воды по 10–20 мл. Затем мерную колбу охлаждали и доводили водой до метки. После этого раствор переливали в обыкновенную колбу на 100 мл, закрывали и хранили до момента анализа.

**Содержание общего азота** измеряли колориметрически по методу Кьельдаля (Унифицированные методы..., 1973). За основную величину в расчетах принималось суммарное содержание всех присутствующих соединений азота, выражаемое величиной общего содержания азота. Общее содержание азота было возможно определить непосредственно после перевода всех соединений азота в аммиак. После мокрого озоления 1 мл раствора переносили в стаканчик на 50 мл. Затем доливали 30–35 мл дистиллированной воды и добавляли сегнетовую соль (на кончике шпателя). С помощью 1%-ного едкого натра доводили рН до 7–8. Полученный раствор переливали в колбу на 50 мл и доводили дистиллированной водой до риски. После чего в колбу приливали 1 мл реактива Несслера и перемешивали. Через 10 минут измеряли оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре (ФЭК) при 400–440 нм в кюветах на 20 мм. В холостую пробу добавляли 50 мл дистиллированной воды и 1 мл реактива Несслера. Затем из величины оптической плотности опытного раствора вычитали оптическую плотность холостой пробы. Все измерения на ФЭКе проводили против дистиллированной воды. Значения содержания общего азота рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения стандартный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  с содержанием азота 0,1 мг/мл. Содержание общего азота в растительном материале вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100}{M} 100\%, \text{ где}$$

X – содержание азота в растительном материале, % от сухой массы;

C – найденная по калибровке концентрация азота ( $\text{NH}_4^+$ ), мг/мл;

100 – объем раствора после озоления, мл;

M – масса навески растительного материала, мг.

**Содержание общего фосфора** измеряли колориметрически по методу Бриггса (Унифицированные методы..., 1973). В основе метода определения фосфора лежит реакция этого элемента с молибдатом аммония в кислой среде. В результате взаимодействия с восстановителем образуется соединение, окрашенное в синий цвет, – молибденовая синь. Плотность развившейся окраски пропорциональна содержанию фосфора в растворе. За основную величину в расчетах принималось суммарное содержание всех присутствующих соединений фосфора, выражаемое величиной общего содержания фосфора. Общее содержание фосфора было возможно определить непосредственно после перевода всех соединений фосфора в неорганические ортофосфаты. Для определения общего фосфора в растительном материале в пробирку приливали 2 мл раствора, полученного после озоления навески. Затем приливали 1 мл раствора молибдата аммония в серной кислоте и 5 мл 10% раствора аскорбиновой кислоты. Тщательно перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 8 мин. После остывания растворы колориметрировали на ФЭКе в 5-миллиметровых кюветах при 620–680 нм. Значения содержания общего фосфора рассчитывали с помощью калибровочной кривой, для построения которой готовили серию стандартных растворов из исходного раствора, содержащего 0,04 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$  в 1 мл.

**Содержание фотосинтетических пигментов** определяли спектрофотометрически. Для экстрагирования пигментов из листьев макрофитов использовали 80% водный раствор ацетона. Растительный материал (0,2 г сырых листьев) растирали в ступке с 1–2 мл 80%-го ацетона с добавлением стеклянного песка и  $\text{CaCO}_3$  для предотвращения

феофитинизации хлорофиллов. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку. Ступку ополаскивали 1–2 мл 80%-го ацетона и сливали его в пробирку. Эту операцию повторяли 2–3 раза. Затем гомогенат центрифугировали при 8000 *g* в течение 10 мин. Супернатант сливали в мерную пробирку объемом 10 мл, осадок дважды промывали и центрифугировали. Полученные экстракты объединяли и доводили 80%-м ацетоном до метки. Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли в одном экстракте, измерив оптическую плотность вытяжки на спектрофотометре при длинах волн 440,5, 649 и 665 нм. Расчет хлорофиллов проводили по формуле Vernon, содержание каротиноидов рассчитывали по Wettstein (Гавриленко, Жигалова, 2003):

$$C_a = 11,63 * D_{665} - 2,39 * D_{649} \text{ (мг/л);}$$

$$C_b = 20,11 * D_{649} - 5,18 * D_{665} \text{ (мг/л);}$$

$$C_{a+b} = 6,45 * D_{665} + 17,72 * D_{649} \text{ (мг/л);}$$

$$C_{кар} = 4,695 * D_{440,5} - 0,268 C_{a+b} \text{ (мг/л).}$$

Содержание фотосинтетических пигментов пересчитывали на единицу массы (мг/г сухой массы).

**Определение показателей мезоструктуры** листьев макрофитов (фрондов ряски) проводили на растительном материале, фиксированном в 3,5% растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2) согласно методике, разработанной в УрГУ (Мокроносков, Борзенкова, 1978; Определение мезоструктурных характеристик..., 2006).

**Отбор проб.** Для мезоструктурного анализа использовали высечки зрелых листьев макрофитов из средней части листа (фронды у ряски целиком), предварительно зафиксированные в растворе глутарового альдегида.

**Получение поперечных срезов листьев.** Срезы делали при помощи замораживающего микротомы и помещали на предметное стекло в каплю глицерина. Сверху накрывали покровным стеклом. Избыток глицерина убирала фильтровальной бумагой.



**Определение толщины листа.** На срезах, приготовленных не менее чем из 10 листьев, делали не менее 10 измерений в каждом листе с помощью программного обеспечения Siams Mesoplant.

**Определение размеров клеток и хлоропластов.** Для подсчета размеров клеток и хлоропластов проводили мацерацию высечек из листьев макрофитов. Несколько высечек с известной площадью помещали в мерную пробирку и приливали раствор 20%-й щелочи (ориентировочно 2 см<sup>2</sup> листьев в 1 мл щелочи). В пламени горелки раствор с высечками доводили до кипения, после чего высечки осторожно растирали стеклянной палочкой до получения гомогенной суспензии. Затем брали каплю суспензии, помещали на предметное стекло и осторожно закрывали покровным. Изображение с микроскопа передавали с помощью видеокамеры на монитор. Измерение площади проекции и линейных размеров клеток и хлоропластов (L – длина, D – диаметр) осуществляли с помощью программного обеспечения Siams Mesoplant.

Площадь поверхности клеток определяли по формуле Коши для выпуклых тел:

$$S = bA.$$

Объем клетки рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{A^2}{P} \sqrt{b^3 K_i}, \text{ где}$$

A – площадь проекции клетки;

P – периметр клетки;

b = 4 (для клеток округлой и цилиндрической формы);

K<sub>i</sub> – коэффициент, если L/D = 1,5, то K<sub>i</sub> = 0,11; если 2,0 ≤ L/D ≤ 2,5, то K<sub>i</sub> = 0,10; если 3,0 ≤ L/D ≤ 20,0, то K<sub>i</sub> = 0,09.

Число повторностей для каждого типа клеток было не менее 30.

Объем и площадь поверхности хлоропластов рассчитывали по формуле для эллипсоида вращения, используя линейные размеры L и D:

$$V = \frac{4}{3} \pi a b^2, S = 4 \pi \sqrt{(a b^2)^2}, \text{ где } a = \frac{L}{2} \text{ и } b = \frac{D}{2},$$

L – наибольший диаметр,

D – наименьший диаметр.

**Подсчет числа хлоропластов в клетке** проводили в суспензии клеток, полученной при мацерации ткани в 20%-й щелочи. Число хлоропластов в клетках определяли на давленных препаратах. Для достоверного подсчета в поле зрения микроскопа выбирали клетки разной величины. Число повторностей составляло не менее 30.

При исследовании **флуктуирующей асимметрии (ФА)** *P. perfoliatus* и *S. natans* было собрано по 210 листовых пластинок каждого вида, на которых произведено 2100 промеров выбранных параметров. Измерения осуществляли с помощью электронного штангенциркуля ШЦЦ-1-125-0.01 с точностью до 0,01 мм. Для оценки величины коэффициента ФА водных макрофитов применяли интегральный показатель – среднее относительное различие между сторонами на признак (Захаров и др., 1996):

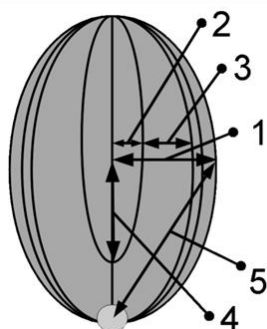
$$X_a = \frac{\sum_{i=1}^k (d_{l-r})_i}{nk},$$

где  $d_{l-r} = \frac{d_l - d_r}{d_l + d_r}$ ,  $k$  – число признаков,  $d_l$ ,  $d_r$  – значение промеров признака

слева и справа соответственно,  $n$  – численность выборки.

При выборе исследуемых морфометрических параметров водных макрофитов руководствовались морфометрическими критериями, предложенными А. А. Изотовым для оценки ФА *P. perfoliatus* (Изотов, 2003).

В соответствии с методикой были сделаны промеры следующих признаков листовой пластинки *P. perfoliatus*:

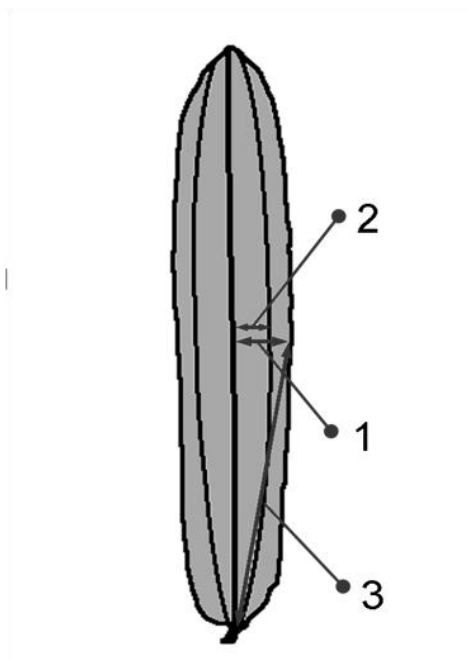


1 – ширина половины листовой пластинки. Измеряли от центральной жилки до края листа; 2 – расстояние от центральной до первой жилки. Первой считали жилку, ближайшую к центральной жилке; 3 – расстояние между первой и второй жилками; 4 – расстояние от середины

листа до основания первой жилки. Основанием первой жилки принималась точка на главной жилке, от которой отходит первая жилка при краевом росте листа; 5 – расстояние от основания листа до половины края листа (рис. 11).

**Рис. 11. Схема анализируемых признаков рдеста пронзеннолистного (*Potamogeton perfoliatus* L.)**

Последний морфометрический признак был введен нами вместо параметра «длина второй жилки», предложенного автором данной методики (Изотов, 2003). Это обусловлено тем, что в полевых условиях при отсутствии



курвиметра не представлялось возможным измерить данный параметр.

В виду того, что *S. natans* имеет меньшее количество жилок, измерения проводили по следующим признакам (рис. 12): 1 – ширина половины листовой пластинки. Измеряли от центральной жилки до края листа;

2 – расстояние от центральной до первой жилки;

3 – расстояние от основания листа до

половины края листа.

**Рис. 12. Схема анализируемых признаков стрелолиста плавающего (*Sagittaria natans* Pall.)**

**Изучение морфометрических параметров водных макрофитов в модельном эксперименте.** Для регистрации динамики роста измеряли длину побегов и корней водных макрофитов при помощи электронного штангенциркуля ШЦЦ-1-125-0.01 с точностью до 0,01 мм. Измерения осуществляли в течение 1 месяца инкубирования растений с поллютантами.

**Определение площади проекции листьев (листецов) и площади их повреждения (депигментации)** осуществляли с помощью компьютерной программы обработки изображений «Контур-Шейд», разработанной автором

(Кислицина, Еремеев, 2015). Площадь листецов ряски анализировали по фотографиям, сделанным с одного и того же расстояния. На каждой фотографии всегда присутствовал эталон с известной площадью, на основе которого можно определить площадь других объектов. Программа «Контур-Шейд» позволяет обвести контуры всего листа (листеца) или его поврежденной части на фотографии и автоматически получить значение площади внутри обозначенного контура. Депигментацию листьев определяли визуально по изменению цвета растительной ткани. Депигментированными считали ткани листа (листеца) желтого и коричневого цвета. Площадь поврежденных участков листьев (листецов) определяли по такому же принципу, как и площадь всего листа.

Перед подсчетом площади листьев *P. perfoliatus* была осуществлена дополнительная подготовка изображений в виду того, что листья данного растения было сложно сфотографировать в расправленном состоянии, не повредив само растение. В связи с этим контуры каждого листа с участками повреждений переводили на кальку, а затем с кальки на бумагу. Полученные изображения сканировали и обрабатывали в программе.

**Статистическая обработка данных.** Биологическая повторность составляла не менее 10 растений, аналитическая – не менее 3. Первичный анализ данных и их статистическую обработку 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 арифметические значения показателей и их стандартные ошибки представлены в таблицах и на рисунках.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **3.1. Исследование токсичности экзогенных фенолов на основе анализа анатомо-морфологических параметров водных макрофитов**

Морфологические исследования растений играют важную роль в работах, связанных с вопросами охраны окружающей среды, в том числе с вопросами определения степени влияния загрязнений на растительные организмы (Коровкин, 2007). Морфологический подход в исследовании устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов среды в последние десятилетия существенно расширился. Среди научных и прикладных проблем, решаемых с помощью морфологических исследований, наиболее важными являются (Жмылев и др., 1993):

- 1) изучение изменчивости жизненной формы видов, специфики их роста и развития в различных экологических условиях,
- 2) познание морфогенетических процессов, определяемых экзогенными факторами,
- 3) установление коррелятивных связей между биоморфологическими признаками и физиологическими процессами,
- 4) установление адаптивного значения морфологических признаков по отношению к отдельному экологическому или комплексу факторов почвенной, водной или воздушной среды.

Тем не менее исследования водных макрофитов, направленные на выявление токсического действия ФС и выяснение механизмов устойчивости к ним на основе анализа анатомо-морфологических параметров, весьма немногочисленны.

В данном разделе представлены результаты исследования анатомо-морфологических параметров водных макрофитов при действии ФС. Произведена оценка токсичности отдельных ФС и выявлено адаптивное значение отдельных морфологических признаков водных макрофитов.

Исследования морфологических показателей высших водных растений были проведены в природных местообитаниях с разным уровнем фенольного

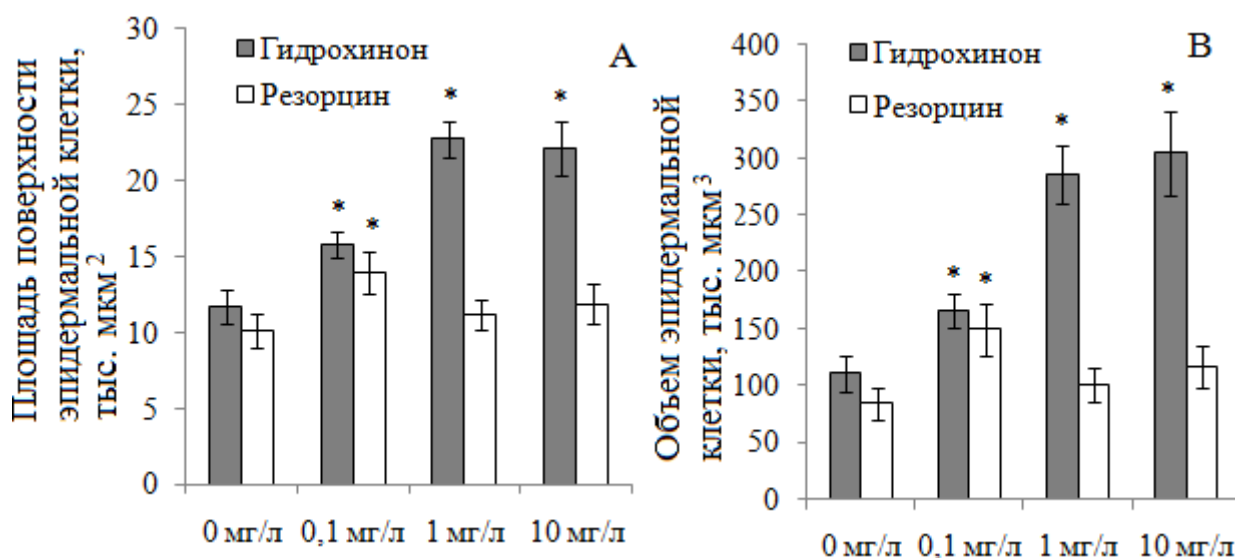
загрязнения. Для уточнения тех или иных эффектов конкретных ФС в исследование были включены модельные эксперименты. Исследования морфологии водных макрофитов были проведены на организменном, органном, тканевом и клеточном уровнях организации. В работе использованы как широко известные методы исследования морфологии растений (изучение мезоструктуры и флуктуирующей асимметрии), так и собственный метод компьютерной диагностики, разработанный автором с соавт. (Кислицина, Еремеев, 2015).

### **3.1.1. Влияние экзогенных дифенолов на мезоструктуру листа водных макрофитов**

При действии неблагоприятных факторов живые системы способны вырабатывать различные защитно-приспособительные механизмы на всех уровнях организации. Выявление связей между анатомо-морфологическими характеристиками растений и условиями их обитания имеет особое значение в связи с возможностью прогнозирования ответных реакций видов на антропогенные воздействия. К настоящему времени влияние химического состава среды обитания на структурно-функциональные характеристики растений изучено недостаточно (Кислицина, Борисова, 2013). В литературе встречаются сведения о влиянии таких важных элементов минерального питания, как азот, калий и фосфор на анатомо-морфологическую структуру растений (Нагалецкий, Николаевский, 1981; Потокин, 1984). Однако данные о влиянии загрязняющих веществ на параметры мезоструктуры растений весьма немногочисленны (Капитонова, 2002; Улицкая, 2004). В связи с этим представлялось важным исследовать влияние ФС на анатомо-морфологические показатели фотосинтетического аппарата водных растений (на примере *Egeria densa* Planch.).

Наши исследования показали, что воздействие дифенолов отражалось на анатомо-морфологических параметрах листьев *E. densa*.

Установлено, что площадь поверхности (рис. 13А) и объем эпидермальных клеток (рис. 13В) в листьях средней части вегетативных побегов *E. densa* возрастали с увеличением концентрации гидрохинона.

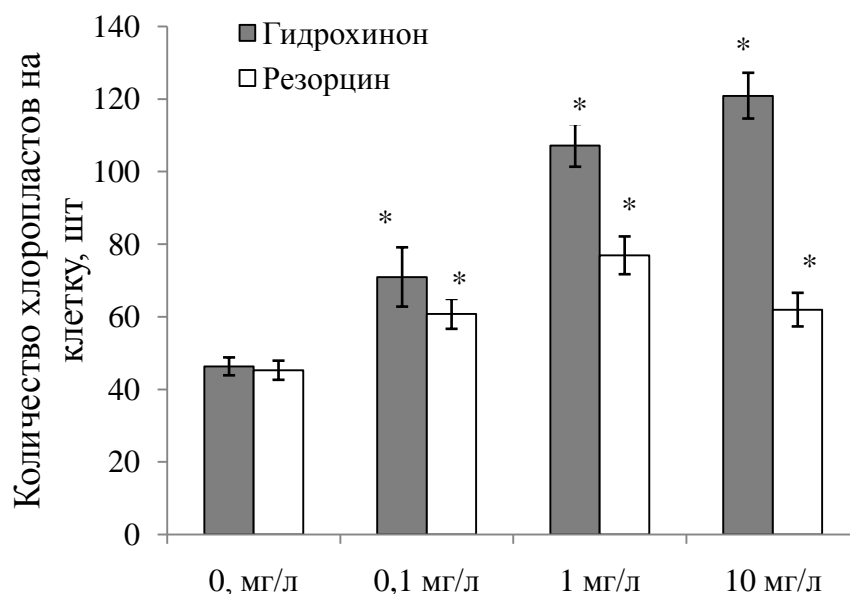


\* достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$

**Рис. 13. Площадь поверхности (А) и объем клеток (В) *E. densa* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

Максимальные значения указанных параметров были отмечены при концентрациях гидрохинона 1 и 10 мг/л. Резорцин приводил к увеличению площади поверхности и объема клеток, но уже при меньшей концентрации – 0,1 мг/л (рис. А, В). При больших концентрациях резорцина достоверных отличий от контроля не обнаружено. В литературе имеются отдельные сведения о том, что гидрохинон в определенных концентрациях обладал рост стимулирующей активностью по отношению к колеоптилям кукурузы (Стом, 1970). Вероятно, в случае с *E. densa* проявился аналогичный эффект. Отмечен достоверный прирост побегов и увеличение площади поверхности и объема клеток эгери. Это можно трактовать как указание на существование определенной связи между действием диоксифенолов и индолилуксусной кислоты, как рост стимулирующего гормона (Кислицина, Борисова, 2013).

Сравнительный анализ параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата *E. densa* показал, что количество хлоропластов в клетках возрастало с увеличением концентрации как гидрохинона, так и резорцина (рис. 14).



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

**Рис. 14. Количество хлоропластов в клетках *E. densa* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

В вариантах с резорцином количество хлоропластов возрастало пропорционально концентрации лишь в случаях, где его концентрация в среде была 0,1 и 1 мг/л. При концентрации резорцина 10 мг/л возрастания количества хлоропластов не происходило.

Что касается параметров хлоропластов в клетках (площадь поверхности, объем) и толщины листа *E. densa*, то достоверных отличий от контроля обнаружено не было (ни в вариантах с гидрохиноном, ни в вариантах с резорцином) (Кислицина, Борисова, 2013).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что *E. densa* обладает способностью противостоять действию таких токсикантов, как гидрохинон и резорцин за счет изменения параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата.

Изучение анатомо-морфологических показателей гидрофитов в связи с фенольным загрязнением представляется важным для выявления видов, обладающих повышенным адаптивным потенциалом. Исследования в данном направлении дают научную основу для более эффективного



использования высших растений в целях биологического мониторинга и фиторемедиации загрязненных водных объектов.

### 3.1.2. Влияние экзогенных дифенолов на системы органов водных макрофитов

Вблизи промышленных стоков нефтеперерабатывающих, лесохимических, аминокрасочных предприятий содержание дифенолов может многократно превышать их предельно допустимые концентрации. В результате происходит нарушение естественных гидроценозов, изменяется их видовой состав и структура (Кислицина, Борисова, 2015). Механизмы и эффекты токсического действия экзогенных фенолов изучены в основном на водных беспозвоночных, водорослях и ихтиофауне (Gillner et al., 1994; Hahn et al., 2006). Воздействие дифенолов сточных вод на высшие водные растения исследовано очень слабо. Между тем, гидрофиты как средообразующий и первично продуцирующий компонент являются определяющим фактором благополучия гидроценоза.

В связи с этим одной из задач данной работы было выявление эффектов длительного воздействия экзогенных дифенолов на морфометрические характеристики водных растений.

В качестве тест-объектов для модельных исследований были выбраны 5 видов гидрофитов, принадлежащих по классификации Л.И. Папченкова (Папченков, 2006) к различным экогруппам настоящих водных растений:

- погруженные укореняющиеся гидрофиты – *Elodea canadensis* Rich. и *Potamogeton perfoliatus* L.;
- укореняющиеся гидрофиты с плавающими на воде листьями – *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch;
- гидрофиты, свободно плавающие на поверхности воды – *Lemna minor* L.

Для решения поставленной задачи была проведена оценка морфометрических характеристик водных растений при выращивании в среде с двузамещенными фенолами – пирокатехином, гидрохиноном и

резорцином. В эксперименте было использовано по 10 побегов элодеи, шелковника и рдеста, каждый из которых имел длину 15 см, фронды ряски (по 30 шт. для каждого варианта опыта). Культивирование растений проводили на водопроводной воде при естественном освещении и комнатной температуре в течение 1 месяца (20 сут в случае с *Lemna minor*) по следующей схеме:

- 1 – водопроводная вода (контроль);
- 2 – водопроводная вода + гидрохинон 1 мг/л;
- 3 – водопроводная вода + гидрохинон 10 мг/л;
- 4 – водопроводная вода + резорцин 1 мг/л;
- 5 – водопроводная вода + резорцин 10 мг/л;

Были изучены следующие морфометрические характеристики растений: длина и количество корней, длина главного и боковых побегов, количество боковых побегов, степень повреждения побегов, количество листьев (фрондов ряски) и их депигментация (табл. 5). Выбор оценочных параметров был обусловлен морфологическими особенностями изучаемых объектов и удобством проведения измерений.

Таблица 5

**Морфометрические параметры водных растений, по которым  
производилась оценка воздействия дифенолов**

<i>Параметр</i>	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	<i>Lemna minor</i>	<i>Batrachium trichophyllum</i>
Длина корней, см на растение	+	+	-	-
Количество корней, шт на растение	+	+	-	-
Длина главного побега, см	+	+	-	-
Длина боковых побегов на растении, см	+	+	-	-
Количество боковых побегов, шт на растение	+	+	-	-

Продолжение таблицы 5

<i>Параметр</i>	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	<i>Lemna minor</i>	<i>Batrachium trichophyllum</i>
Количество листьев (фрондов ряски), шт	-	+	+	+
Количество поврежденных листовых сегментов, шт на растение	-	-	-	+
Депигментация листьев (фрондов), % от общей поверхности	-	+	+	-

**Влияние экзогенных дифенолов на погруженные укореняющиеся гидрофиты.** Результаты морфометрических исследований растений из экогруппы «Погруженные укореняющиеся гидрофиты» показали, что гидрохинон негативно воздействовал на процессы корнеобразования. Отмечено снижение количества и длины корней *E. canadensis* (рис. 15А, В) и *P. perfoliatus* (рис. 16А, В) на 30-й день экспозиции в 1,5–2 раза по сравнению с контролем. Гидрохинон в концентрации 10 мг/л полностью подавлял процессы корнеобразования у *P. perfoliatus* и в значительной степени у *E. canadensis*. При культивировании растений в среде с резорцином обнаружен стимулирующий эффект на рост корней *P. perfoliatus*: корни начали образовываться на 5 дней раньше, а их количество было в 1,5–3 раза выше по сравнению с контролем. Следует отметить, что при высокой концентрации резорцина (10 мг/л) корней образовывалось больше, чем при низкой концентрации (1 мг/л).

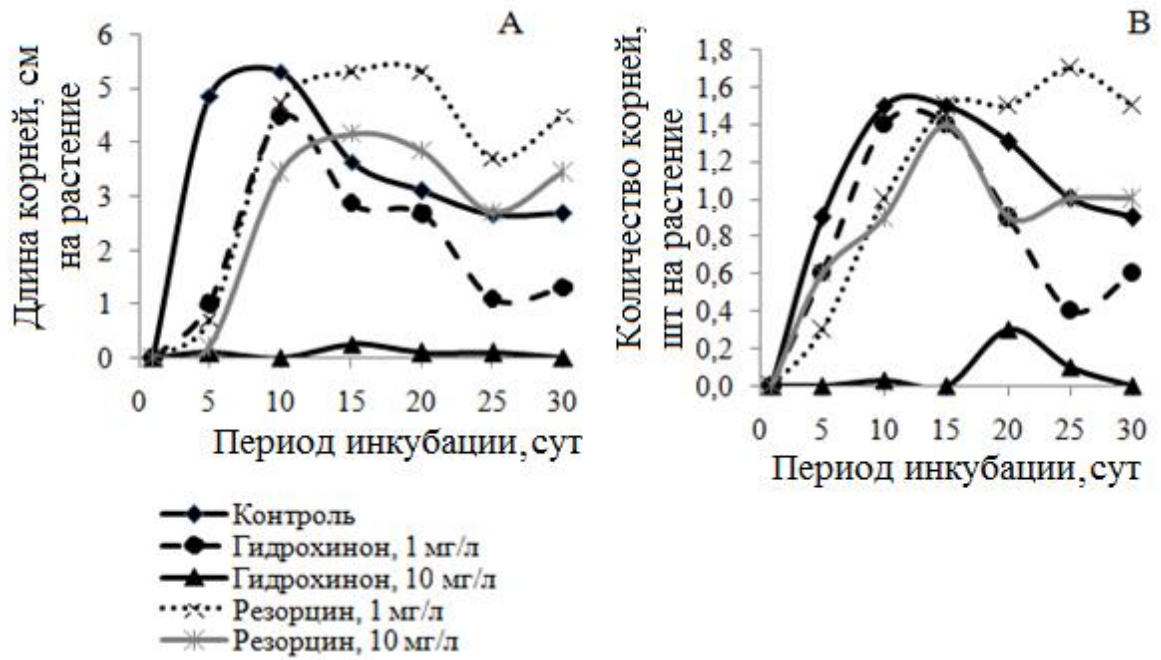


Рис. 15. Длина (А) и количество корней (В) *E. canadensis* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

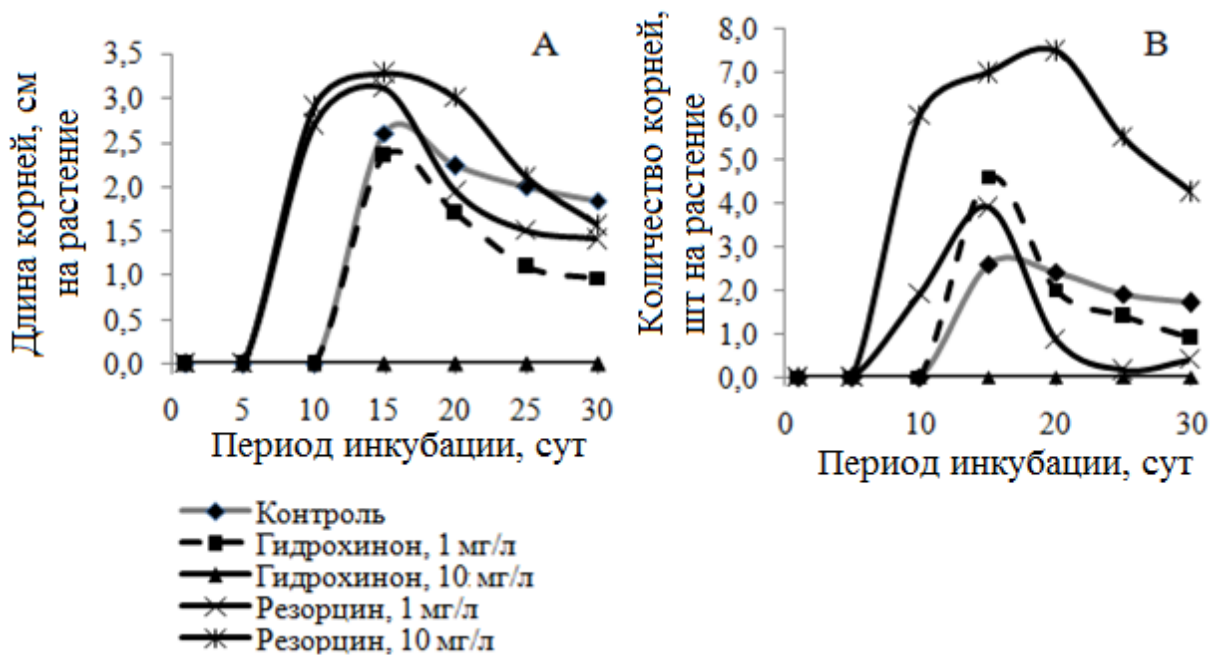
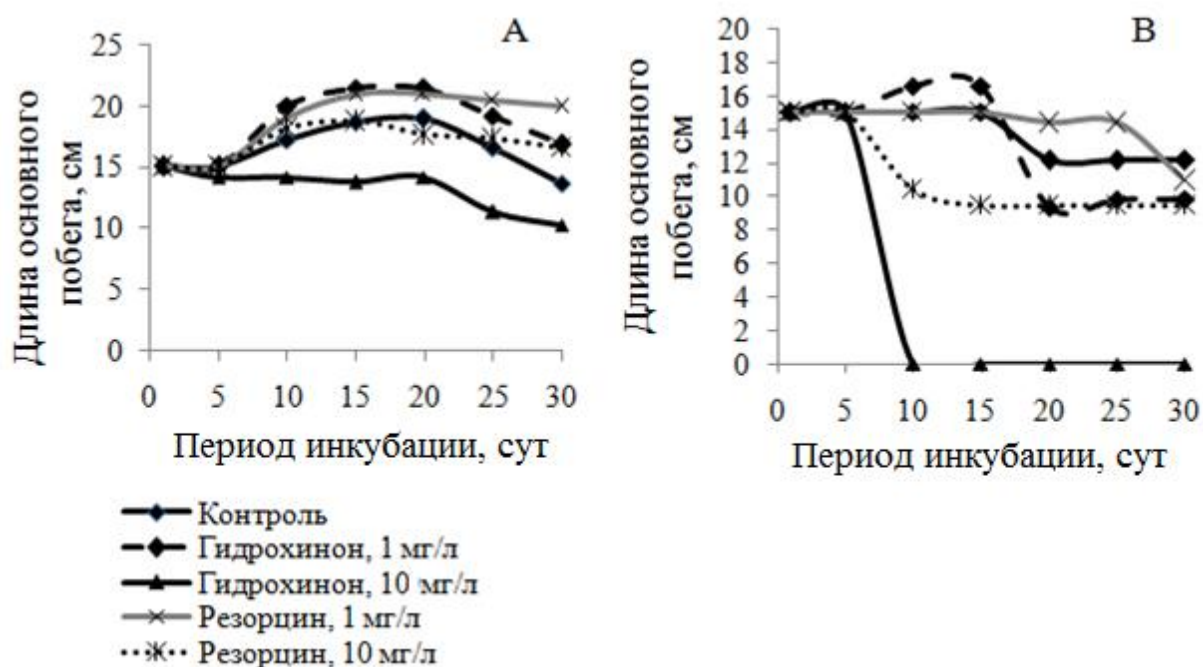


Рис. 16. Длина (А) и количество корней (В) *P. perfoliatus* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

Наиболее сильное отрицательное воздействие на прирост главного побега *E. canadensis* и *P. perfoliatus* оказал гидрохинон (10 мг/л). При данной концентрации прирост побега был полностью ингибирован. Уже через 5 дней инкубирования *P. perfoliatus* в среде с гидрохиноном в данной концентрации

происходило почернение стеблей, их ослизнение и отмирание, а на 7-й день – полная гибель растений. *E. canadensis* оказалась более устойчивой к воздействию высокой концентрации гидрохинона: повреждение главного побега выражалось в побурении участков стебля без его размягчения и ослизнения. Степень повреждения главного побега *E. canadensis* составляла 32% (30-й день экспозиции). Гидрохинон (1 мг/л) и резорцин (1 и 10 мг/л) не оказывали существенного влияния на прирост главного побега *E. canadensis*, но приводили к ингибированию роста главного побега *P. perfoliatus* (рис. 17А, В).



**Рис. 17. Длина основного побега *E. canadensis* (А) и *P. perfoliatus* (В) при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

Боковые побеги *E. canadensis*, выросшие в среде с гидрохиноном (1 и 10 мг/л), не отличались от контроля по количеству, но их рост в длину был подавлен (рис.18А, В). У *P. perfoliatus* через два дня после появления боковых побегов наблюдалось ингибирование их роста и постепенное отмирание в среде, содержащей гидрохинон в концентрации 1 мг/л (рис.19 В). При концентрации гидрохинона 10 мг/л боковые побеги не образовывались. Резорцин при концентрации 1 и 10 мг/л оказывал ингибирующее влияние на развитие боковых побегов *E. canadensis*, а при

концентрации 10 мг/л – стимулирующее влияние на рост боковых побегов *P. perfoliatus*.

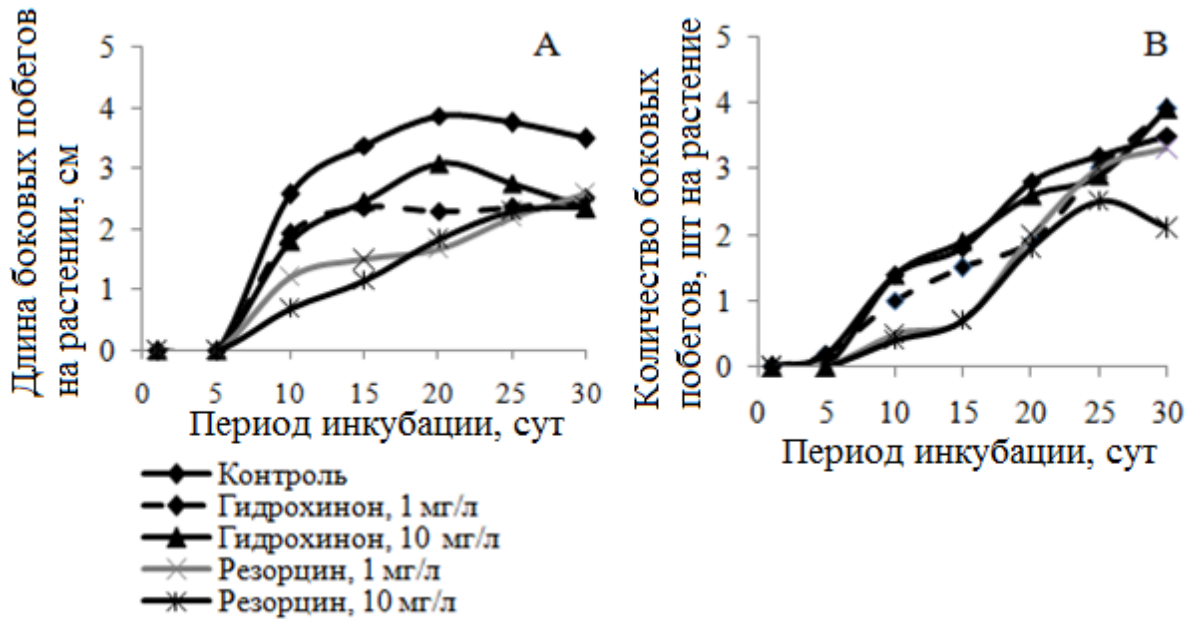


Рис. 18. Длина (А) и количество боковых побегов (В) *E. canadensis* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

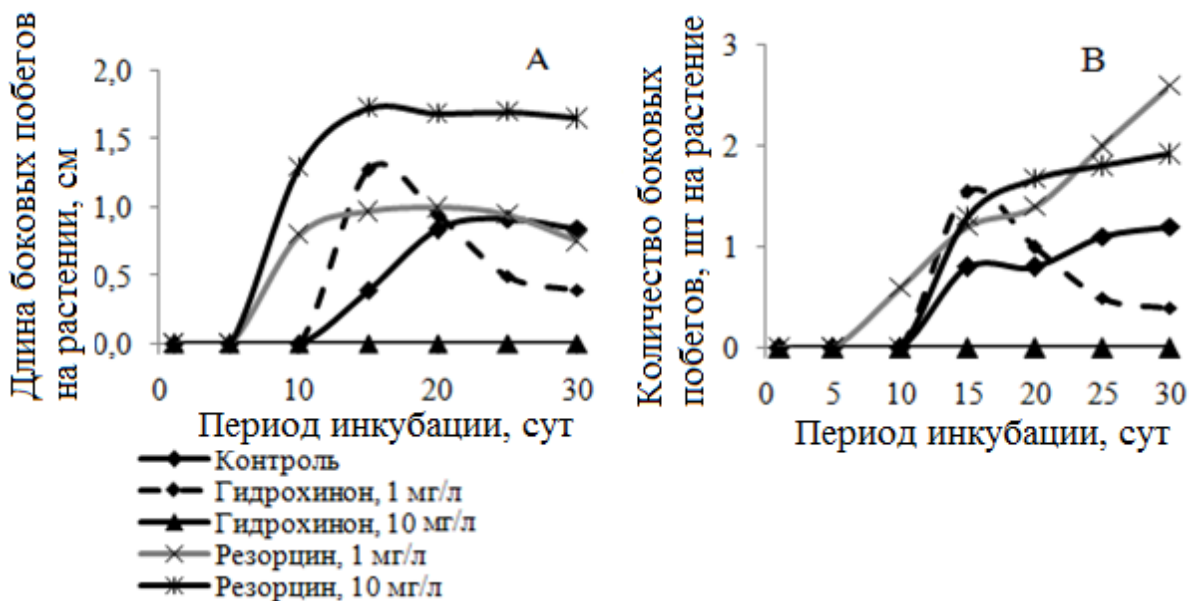
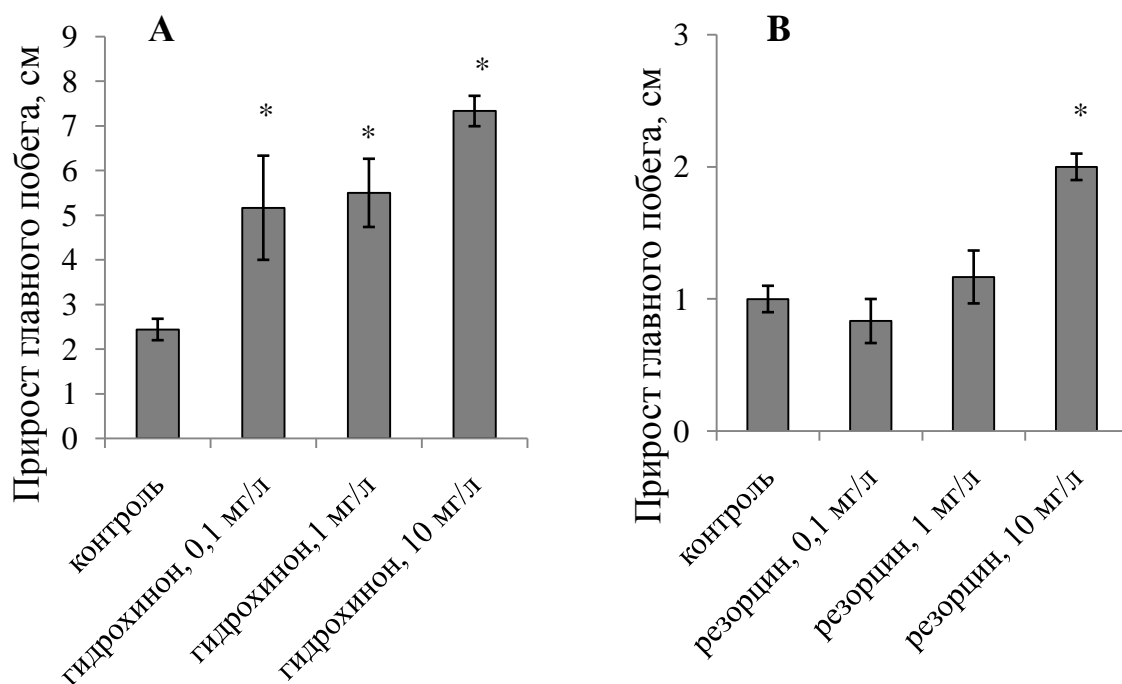


Рис. 19. Длина (А) и количество боковых побегов (В) *P. perfoliatus* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

Следует отметить, что в зависимости от видовой принадлежности растений эффекты действия дифенолов могут существенно отличаться. В частности, нами было установлено, что гидрохинон и резорцин оказывали стимулирующее воздействие на прирост другого вида – *E. densa* (рис.20).



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

**Рис. 20.** Прирост главного побега *E. densa* при инкубировании с гидрохиноном (А) и резорцином (В)

Наибольший прирост побегов *E. densa* наблюдался при концентрации гидрохинона и резорцина 10 мг/л. В случае с гидрохиноном за 2 месяца прирост был в 3 раза выше по сравнению с растениями из контрольного варианта (Кислицина, Борисова, 2013).

Полученные результаты согласуются с литературными данными (Кирсо и др., 1988), в которых было отмечено рост стимулирующее влияние *o*-диоксифенолов на *E. canadensis*. В наших исследованиях была обнаружена подобная тенденция и в отношении *m*-диоксифенола (резорцина), на примере *E. densa* (Кислицина, Борисова, 2013). Этот факт наиболее интересен в силу слабой изученности механизмов данного проявления. Возможно, здесь имеет место способность некоторых фенолов изменять эндогенный уровень фитогормонов (Кефели, 1974), что сказывается на определенных проявлениях морфогенеза. В частности, обнаружение тесной функциональной связи между фенольным и ауксиновым обменом дает основания для такого предположения (Волынец, 2005).

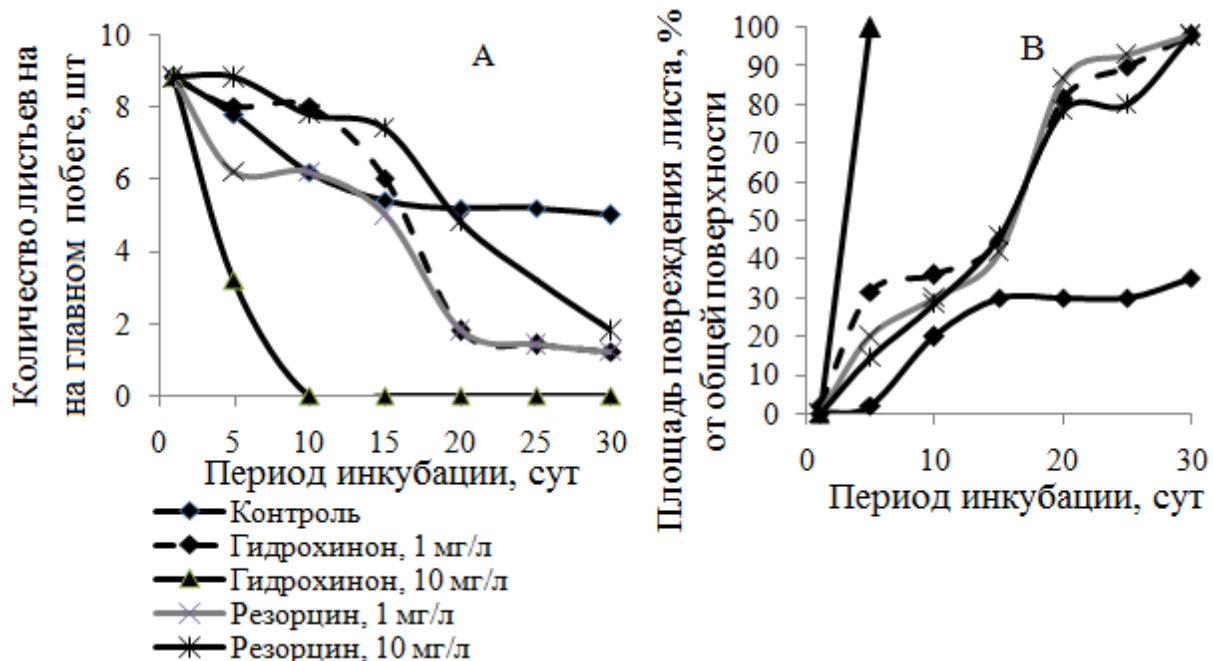
Морфометрические параметры листьев погруженных укореняющихся гидрофитов были изучены на примере *P. perfoliatus*. Выбор данного объекта обусловлен удобством проведения количественного учета листьев и возможностью получить данные о степени их депигментации без механического повреждения растений.

*E. canadensis* для получения морфометрических данных листа в нативном состоянии оказалась не вполне подходящим объектом ввиду мелких размеров листьев, густо расположенных на стебле. Это сильно затрудняло ежедневный подсчет и измерение степени депигментации листьев. В связи с этим, данные по морфометрии листьев были получены только для *P. perfoliatus*.

Подавление роста листьев и снижение их количества из-за начавшихся процессов деградации происходило у *P. perfoliatus* при всех концентрациях гидрохинона. Так, количество листьев *P. perfoliatus* снизилось в 2 раза на 18 сутки инкубирования при концентрации гидрохинона 1 мг/л (рис. 21).

Повреждение визуально выражалось в появлении желтых пятен на листьях, что, вероятно, говорит о разрушении зеленых пигментов. Желтый цвет пятен, возможно, свидетельствует об устойчивости каротиноидов к действию гидрохинона в данной концентрации. При концентрации гидрохинона 10 мг/л отмирание всех листьев происходило на 7 сутки. Следует отметить, что при концентрации гидрохинона 10 мг/л депигментации листьев не наблюдалось: листья приобретали сероватый оттенок, ослизнялись и отмирали.

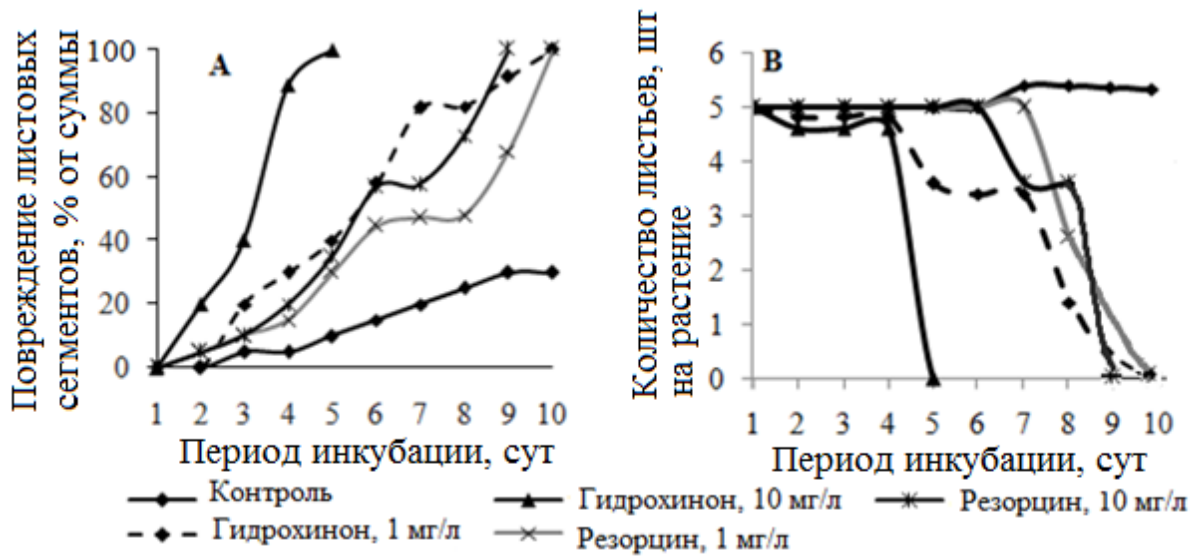




**Рис. 21.** Количество листьев на побеге (А) и площадь повреждения листьев (В) *P. perfoliatus* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

Это говорит о высокой токсичности данной концентрации гидрохинона. При культивировании растений в среде с резорцином также был обнаружен токсический эффект, проявляющийся в подавлении роста листьев и их депигментации. Депигментация листьев выражалась в появлении не желтых, как в случае с гидрохиноном, а белых пятен на листьях. Возможно, это связано с тем, что резорцин вызывал деградацию не только хлорофиллов, но и каротиноидов в листьях растений. Степень депигментации листьев *P. perfoliatus* достигла 50% на 14 сутки при инкубировании с резорцином в концентрации 1 мг/л и на 18 сутки – в концентрации 10 мг/л. Количество листьев *P. perfoliatus* при инкубации с резорцином снизилось более чем в 4 раза к концу срока экспозиции.

**Влияние экзогенных дифенолов на укореняющиеся гидрофиты с плавающими на воде листьями.** В результате исследований было показано, что у растений *B. trichophyllum* при концентрации гидрохинона 1 и 10 мг/л происходило подавление роста листьев и снижение их количества из-за начавшихся процессов деградации (рис. 22).



**Рис. 22. Повреждение листовых сегментов (А) и количество листьев (В) *V. trichophyllum* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

Так, количество листьев *V. trichophyllum* при концентрации гидрохинона 1 мг/л снизилось на 28% на 5 сутки инкубирования. При концентрации 10 мг/л происходило полное отмирание листьев. Повреждение листьев выражалось в потемнении листовых сегментов с последующим ослизнением. Все это может свидетельствовать о глубоком повреждении тканей под воздействием гидрохинона из-за высокой его токсичности. При культивировании растений в среде с резорцином также был обнаружен токсический эффект, проявляющийся в подавлении роста листьев и их отмирании. Потемнение более чем половины листовых сегментов происходило на 7 сутки при концентрации резорцина 1 мг/л и на 5 сутки при концентрации резорцина 10 мг/л. Количество листьев у *V. trichophyllum* при инкубации с резорцином начало снижаться на 6–7 сутки экспозиции.

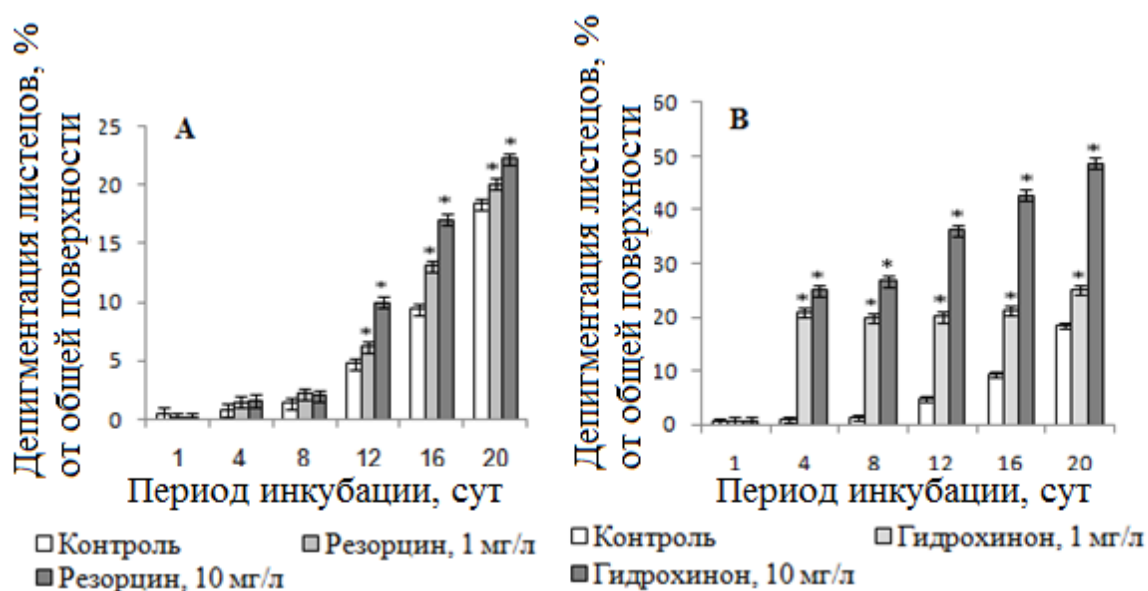
#### ***Влияние экзогенных дифенолов на свободно плавающие гидроритмы***

Наиболее четкие закономерности влияния резорцина и гидрохинона выявлены в модельных экспериментах с использованием *L. minor*.

Ответные реакции ряски на действие фенолов изучали путем оценки степени депигментации листочков (в динамике) и измерения площади

проекции клеток мезофилла и эпидермиса, а также хлоропластов (по окончании инкубирования).

Показано, что степень депигментации листецов *L. minor* зависела от концентрации, вида поллютанта и времени экспозиции с фенолами (рис. 23). Добавление резорцина (1 и 10 мг/л) не приводило к значительному увеличению площади депигментации листецов по сравнению с контролем. На 20-й день экспозиции были отмечены сопоставимые признаки хлороза в контрольном и опытных вариантах с резорцином. Хлороз выражался в появлении желтых и белых пятен, что, вероятно, связано с естественным старением отдельных материнских листецов.



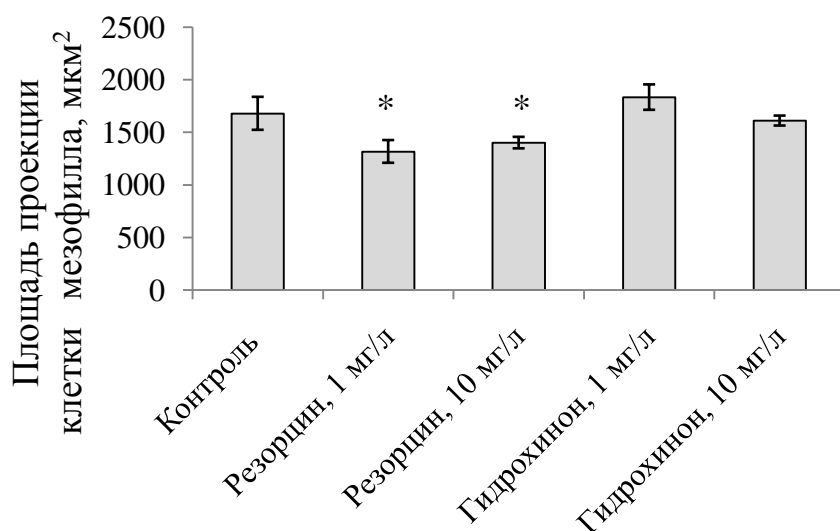
\* достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$

**Рис. 23.** Площадь депигментации листецов *L. minor* при инкубировании с резорцином (А) и гидрохиноном (В)

Гидрохинон вызывал более значительное повреждение листецов ряски, особенно при концентрации 10 мг/л: степень депигментации при данной концентрации была в 2,6 раза выше по сравнению с контролем. По-видимому, уменьшение количества фотосинтетических пигментов у ряски в присутствии ФС можно объяснить как их деградацией, так и ингибированием синтеза в результате активации процессов свободнорадикального окисления.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что среди двухатомных фенолов наиболее токсичными для высших водных растений являются гидрохинон и пирокатехин (Тимофеева и др., 1981; Кирсо и др., 1988). Механизм высокой токсичности данных соединений связан с образованием высокореакционных промежуточных продуктов, в частности, бензохинонов, образующихся в результате их окисления (Stom, 1977; Стом, 1982). Резорцин не способен образовывать хиноны, а его окисление приводит к сложной смеси продуктов с образованием ацетатов и производных пировиноградной кислоты (Кирсо и др., 1988). Очевидно, особенности биохимического окисления резорцина не оказали существенного влияния на видимое повреждение листецов ряски по сравнению с контролем.

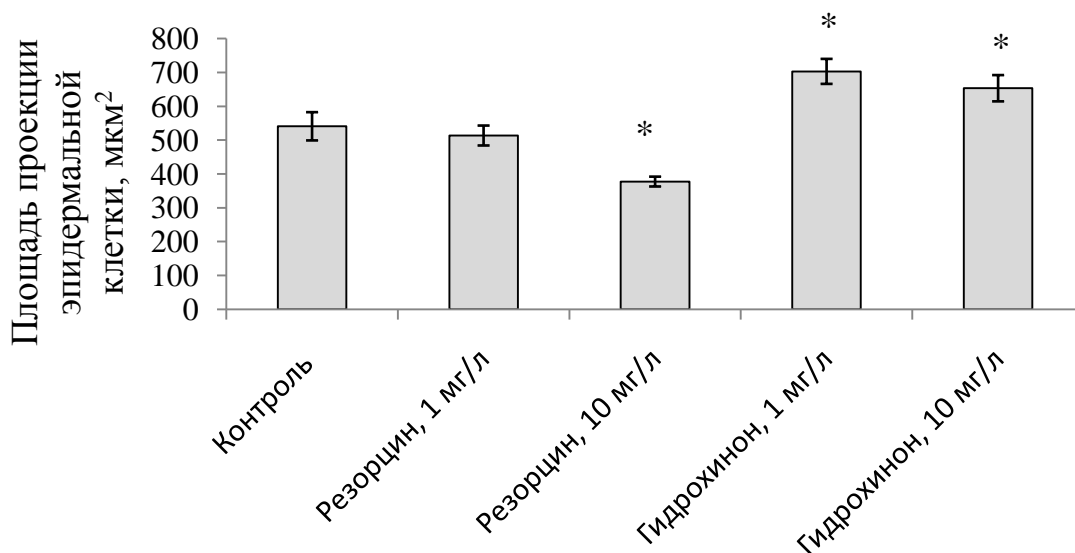
Для оценки влияния ФС на фотосинтетический аппарат ряски малой были проведены измерения площади проекции клеток мезофилла и эпидермиса. Показано, что клетки мезофилла у *L. minor*, инкубированной в среде с резорцином, отличались меньшими размерами (на 17–22 %) по сравнению с контрольным вариантом (рис. 24). Достоверных отличий от контроля в вариантах с гидрохиноном обнаружено не было.



**Рис. 24.** Площадь проекции клеток мезофилла *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином

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

При исследовании площади проекции эпидермальных клеток *L. minor* выявлено, что в присутствии гидрохинона (1 и 10 мг/л) размеры клеток увеличивались по сравнению с контролем на 17 и 23 % соответственно (рис. 25).



**Рис. 25. Площадь проекции эпидермальных клеток *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

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

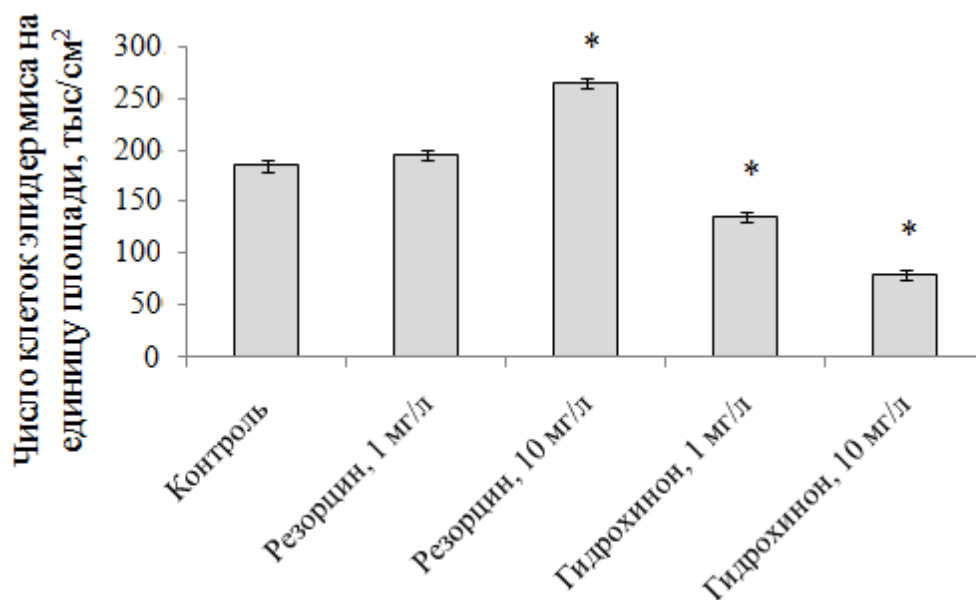
Эффект увеличения размеров клеток растений в ответ на загрязнение окружающей среды был обнаружен во многих исследованиях (Потокин, 1984; Капитонова, 2002; Чукина и др. 2009). Вероятно, это является неспецифической реакцией, характерной как для водных, так и для наземных растений. Увеличение размеров эпидермальных клеток в присутствии гидрохинона, по-видимому, связано с интенсификацией процесса вакуолизации. Известно, что воздействие некоторых экзогенных ФС индуцирует в клетках растений защитные механизмы, связанные со слиянием вакуолей малых размеров и образованием из них более крупных органелл, которые занимают большое внутриклеточное пространство (Квеситадзе и др., 2005). Процесс депонирования трансформированных экзогенных фенолов в вакуолях позволяет клетке существенно уменьшить их токсический эффект.

В то же время, возрастание объема вакуоли приводит к растяжению и самой клетки.

Под действием резорцина (10 мг/л) площадь проекции эпидермальных клеток уменьшалась на 30 %, в то время как его пониженная концентрация (1 мг/л) влияния на размеры клеток эпидермиса не оказала (рис. 25).

Таким образом, однонаправленных тенденций в отношении влияния исследованных ФС на параметры клеток мезофилла и эпидермиса ряски не выявлено. Более отчетливо выраженные различия между вариантами по размерам эпидермальных клеток, вероятно, можно объяснить тем, что клетки эпидермиса, находясь в непосредственном контакте с фенолами, испытывали большее воздействие по сравнению с клетками мезофилла.

Несмотря на общее снижение площади проекции эпидермальных клеток под действием резорцина (10 мг/л), число клеток на единицу площади листецов было больше в среднем на 60% по сравнению с вариантами, в которых ряска подвергалась действию гидрохинона (рис. 26).

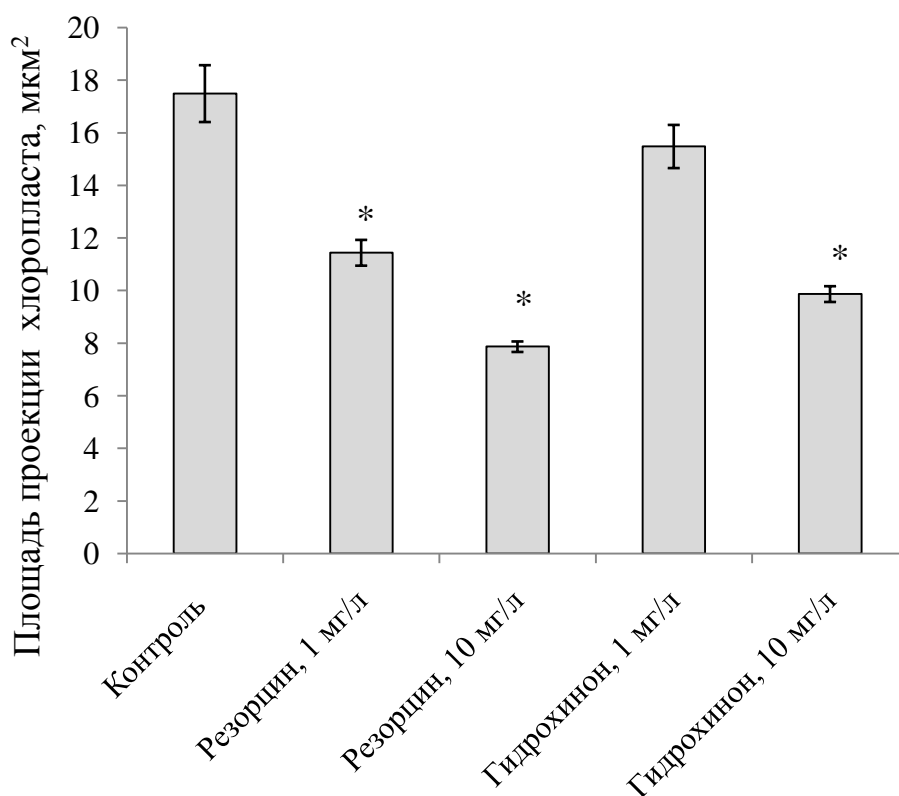


**Рис. 26. Число клеток эпидермиса на единицу площади листецов *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

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

Очевидно, что в вариантах с резорцином увеличение поверхности листецов ряски происходило преимущественно за счет деления клеток, а в вариантах с гидрохиноном – за счет их растяжения.

Для оценки влияния ФС на размеры хлоропластов у ряски малой была определена площадь их проекции (рис. 27). Из полученных данных видно, что гидрохинон и резорцин оказывали отрицательное влияние на фотосинтетический аппарат: в их присутствии площадь проекции хлоропластов уменьшалась на 11–55%. Наиболее отчетливо этот эффект наблюдался в присутствии ФС при концентрации 10 мг/л.



**Рис. 27. Площадь проекции хлоропластов *L. minor* при инкубировании с гидрохиноном и резорцином**

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

Полученные данные свидетельствуют об отчетливо выраженном влиянии экзогенных ФС на пигментный аппарат и мезоструктуру фотосинтетического аппарата ряски малой, что отражалось на степени депигментации листецов и размерах клеток и хлоропластов. Изменения в

структурно-функциональной организации водных растений можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию, направленную на повышение устойчивости к действию фенолов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что гидрохинон токсичнее резорцина для растений всех изученных экогрупп. *E. canadensis* обладает большей устойчивостью к высоким концентрациям гидрохинона. Отмечено, что экзогенный резорцин может проявлять стимулирующий эффект на рост корней и побегов *P. perfoliatus*. Этот факт наиболее интересен в силу слабой изученности механизмов данного проявления. Возможно, здесь имеет место способность некоторых фенолов изменять эндогенный уровень фитогормонов (Кефели, 1974), что сказывается на определенных проявлениях морфогенеза.

Из представленных данных следует, что различные проявления воздействия дифенолов на морфометрические характеристики корней, побегов и листьев гидрофитов в значительной степени определяются видовыми особенностями растений, типом поллютанта и могут варьироваться на фоне различных концентраций ФС.

### **3.1.3. Флуктуирующая асимметрия водных макрофитов**

В популяциях растений, существующих длительное время, поддерживается определенный уровень стабильности развития (Шадрина, Вольперт, 2006). Нарушение развития происходит в популяциях, существующих на пределе экологических возможностей вида (Соколова, Камалтдинова, 2011).

Одним из методов оценки стабильности развития вида является определение интегрального показателя флуктуирующей асимметрии (ФА) (Кузнецов, Голышкин, 2008).

Под ФА понимают незначительные и случайные отклонения от строгой билатеральной симметрии биообъектов (Константинов, 2001; Кузнецов, Голышкин, 2008). А.А.Гуртык и В.В. Углеv (2010) подчеркивают, что при ФА различия между сторонами не являются строго генетически



детерминированными. Эта асимметрия, в отличие от направленной асимметрии и антисимметрии, не имеет самостоятельного адаптивного значения. Она лишь выражение незначительных нарушений симметрии, допускаемых естественным отбором, и отражает стабильность развития. Оценка величины флуктуирующей асимметрии, по словам авторов, представляет собой корректный способ формализации степени отклонения развития особи и даже популяции от нормы (Гуртяк, Углеv, 2010).

Необходимо заметить, что методы оценки стабильности развития организма по флуктуирующей асимметрии достаточно разработаны для наземных организмов (Изотов, 2001). В то же время высшие водные растения в этом аспекте изучены крайне слабо.

Исследование ФА проводили на примере отдельных признаков листовой пластинки *P. perfoliatus*, *S. natans* (табл.6, 7)

Таблица 6

**Значения индекса флуктуирующей асимметрии некоторых признаков в различных местах произрастания *P. perfoliatus***

<b>Признаки</b>	<b>Фоновый участок р. Ляля</b>	<b>Импактный участок р. Ляля</b>
Ширина половины листовой пластинки, мм	0,028 (0,000–0,094)	0,026 (0,000–0,096)
Расстояние от центральной до первой жилки, мм	0,035 (0,000–0,167)	0,031 (0,000–0,123)
Расстояние между первой и второй жилками, мм	0,041 (0,000–0,194)	0,038 (0,000–0,177)
Расстояние от середины листа до основания первой жилки, мм	0,012 (0,0002–0,066)	0,038 (0,0002–0,053)
Расстояние от основания листа до ½ края листа, мм	0,014 (0,000–0,089)	0,012 (0,000–0,066)
Интегральный показатель ФА	0,026 (0,002–0,084)	0,024 (0,003–0,091)

**Примечание:** В скобках представлены максимальные и минимальные значения исследуемого признака (мм).

Выбор признаков обусловлен определенным типом жилкования листовой пластинки, удобством измерения и встречаемостью видов как в загрязненном участке русла р. Ляля, так и в условно чистом.

Таблица 7

**Значения индекса флуктуирующей асимметрии некоторых признаков в различных местах произрастания *S. natans***

<b>Признаки</b>	<b>Фоновый участок р. Ляля</b>	<b>Импактный участок р. Ляля</b>
Ширина половины листовой пластинки, мм	0,02 (0,00–0,11)	0,03(0,00–0,13)
Расстояние от центральной до первой жилки, мм	0,03 (0,00–0,17)	0,03 (0,00–0,17)
Расстояние от основания листа до ½ края листа, мм	0,003 (0,000–0,016)	0,01 (0,000–0,017)
Интегральный показатель ФА	0,02 (0,00–0,06)	0,02 (0,00–0,09)

**Примечание:** В скобках представлены максимальные и минимальные значения исследуемого признака (мм).

Принято считать, что в условиях антропогенного воздействия на экосистему того или иного водного объекта показатель асимметрии имеет более высокие значения по сравнению с точками, претерпевающими меньшее антропогенное воздействие (Изотов, 2003).

Наши исследования показали, что достоверных отличий по отдельным признакам и интегральному показателю ФА листовой пластинки *P. perfoliatus* и *S. natans* не наблюдалось. Величина индекса ФА не превышала 0,040, что соответствует условной норме в стабильности развития (табл.8).

**Пятибалльная шкала оценки отклонений состояния организма от условной нормы по величине интегрального показателя стабильности развития (Захаров, 2000)**

<b>Балл</b>	<b>Величина показателя стабильности развития</b>
I	<0,040 (условная норма)
II	0,040–0,044 (начальные отклонения от нормы)
III	0,045–0,049 (средний уровень отклонений от нормы)
IV	0,050–0,054 (значительные отклонения от нормы)
V	>0,054 (критическое состояние)

Первоначально данная шкала разработана В.М. Захаровым с соавт. (Захаров, 2000) для оценки стабильности развития березы повислой (*Betula pendula*). В настоящее время метод получил распространение и для оценки стабильности развития других видов растений (Соколова, Камалтдинова, 2011; Мокин, 2015). Метод оценки стабильности развития водных макрофитов, подверженных загрязнению ФС, с использованием пятибалльной шкалы опробован впервые.

**3.1.4. Изменение параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата водных макрофитов из природных местообитаний, подверженных действию фенольных соединений**

Загрязнение гидросистем токсическими веществами, попадающими в водные объекты в результате хозяйственной деятельности человека, способно привести к необратимым изменениям в биоценозах, к резкому увеличению генетического груза в популяциях, к изменению численности и структуры видов или даже к их вымиранию (Павленко, 1981). В связи с этим актуальны вопросы прогнозирования биологических последствий влияния

промышленных стоков на водные растения – важнейший средообразующий компонент водных экосистем, от которого зависит функционирование гидроценоза в целом (Кислицина, Борисова, 2015).

Одной из задач исследования являлось изучение влияния промышленных стоков целлюлозно-бумажного предприятия на некоторые анатомические показатели водных растений, отражающие их способность противостоять действию техногенно нарушенной среды.

Объектами исследования были погруженные (*Eloдея канадская* (*Eloдея canadensis* Michx., *Ватрахиум трихофиллум* (*Ватрахиум trichophyllum* (Chaix) Bosch, *Сagittaria natans* Pall, *Потamoгетон перфолиатус* L., ) и прибрежно-водные растения (*Спаргангиум эмерсум* (*Спаргангиум emersum* Rehm, *Алиσμα плантаго-акуатика* L., *Сagittaria sagittifolia* L.), собранные в горно-таежной р. Ляля в окрестностях Новолялинского целлюлозно-бумажного комбината (ЦБК, Свердловская обл.).

Среди органических отходов целлюлозно-бумажного производства значительное место занимает лигнин (Непенин, 1990). При деструкции лигнина освобождается ~55 различных химических компонентов, преимущественно фенольных соединений (фенол, гваякол, пирокатехин, *о*, *м*, *п*-крезол, пирогаллол) (Струнников, Тищенко, 1965).

Значения показателей мезоструктуры растений приведены в таблице 9.

Результаты исследований показали, что изучаемые растения можно разделить на две группы по характеру изменения параметров мезоструктуры под воздействием сточных вод ЦБК.

1 группа характеризовалась уменьшением тех или иных параметров мезоструктуры в условиях загрязнения. В эту группу можно отнести *E. canadensis*, *S. emersum*, *S. sagittifolia*.

У *E. canadensis* на импактном участке реки количество хлоропластов на клетку было меньше, чем на фоновом.

*S. emersum* отличался меньшими размерами клеток и хлоропластов.

Параметры мезоструктуры *S. sagittifolia*, такие как толщина листа, площадь поверхности и объем клеток (эпидермиса и мезофилла), объем хлоропластов также были меньше в импактном участке реки.

Уменьшение размеров указанных параметров растений из импактной зоны могло быть связано с замедлением их роста, которое могло произойти вследствие целого ряда экзогенных и эндогенных факторов.

У 2 группы растений, напротив, параметры мезоструктуры отличались большими размерами. *B. trichophyllum* из импактного участка русла отличался большими значениями по всем изучаемым характеристикам. *P. perfoliatus* характеризовался большими размерами клеток мезофилла и возрастанием толщины листа.

У *S. natans*, выросших на импактном участке реки, размеры эпидермальных клеток, количество хлоропластов и толщина листа были больше, чем в фоновом участке. У *A. plantago-aquatica* из импактного участка русла толщина листа, объем эпидермальных клеток и хлоропластов также были выше.

Увеличение тех или иных характеристик листа водных макрофитов, вероятно, следует считать морфофизиологическими адаптациями к загрязнению среды обитания. В частности, увеличение площади поверхности и объема клеток эпидермы и мезофилла растений из импактного участка реки могло произойти вследствие возрастания объема вакуоли, играющей ключевую роль в инактивации поступающих в клетки поллютантов и продуктов их трансформации. Возрастание объема и количества хлоропластов, по-видимому, связано с необходимостью интенсификации энергетических процессов в клетках растений. Очевидно, что в неблагоприятных условиях существования возникает потребность в дополнительном расходовании энергии на биосинтез защитных соединений, активацию систем репарации и другие процессы. Иными словами, для повышения устойчивости требуется «настроить» метаболические процессы по отношению к имеющимся условиям существования.

Таким образом, повышение устойчивости макрофитов 2 группы к поллютантам сточных вод ЦБК шло по пути регуляции ключевых анатомо-морфологических характеристик их структурной организации.

Таблица 9

## Показатели мезоструктуры водных растений из фонового и импактного участков р. Ляля

Параметр	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Sparganium emersum</i>	<i>Batrachium trichophyllum</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	<i>Sagittaria natans</i>	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
Толщина листа, мкм	$\frac{57.5 \pm 1.7}{58.8 \pm 5.1}$	$\frac{31.8 \pm 1.7}{33.2 \pm 1.1}$	$\frac{141.3 \pm 5.25^*}{196.5 \pm 7.0}$	$\frac{49.8 \pm 2.6^*}{58.2 \pm 1.5}$	$\frac{204.1 \pm 14.9^*}{243.3 \pm 13.9}$	$\frac{221.3 \pm 11.2^*}{198.2 \pm 7.1}$	$\frac{186.5 \pm 18.3^*}{217.1 \pm 19.1}$
Площадь поверхности эпидермальной клетки, тыс. мкм <sup>2</sup>	$\frac{7.4 \pm 0.2}{6.9 \pm 0.4}$	$\frac{3.3 \pm 0.4^*}{2.2 \pm 0.4}$	$\frac{2.9 \pm 0.2^*}{4.6 \pm 0.2}$	$\frac{3.8 \pm 0.3}{3.6 \pm 0.2}$	$\frac{4.7 \pm 0.3^*}{5.6 \pm 0.5}$	$\frac{6.2 \pm 1.1^*}{2.3 \pm 0.5}$	$\frac{20.1 \pm 1.2}{21.1 \pm 1.5}$
Площадь поверхности клетки мезофилла, тыс. мкм <sup>2</sup>	– **	– **	$\frac{2.4 \pm 0.1^*}{3.3 \pm 0.1}$	$\frac{1.9 \pm 0.1^*}{2.9 \pm 0.1}$	$\frac{6.3 \pm 0.7}{6.5 \pm 0.7}$	$\frac{5.0 \pm 0.7^*}{1.2 \pm 0.1}$	$\frac{10.7 \pm 0.9}{11.2 \pm 1.0}$
Объем эпидермальной клетки, тыс. мкм <sup>3</sup>	$\frac{77.8 \pm 8.0}{66.7 \pm 6.1}$	$\frac{18.1 \pm 3.9^*}{10.1 \pm 2.7}$	$\frac{11.8 \pm 1.1^*}{23.2 \pm 1.4}$	$\frac{17.6 \pm 2.2}{16.0 \pm 1.4}$	$\frac{20.1 \pm 1.8^*}{26.4 \pm 3.0}$	$\frac{38.9 \pm 10.5^*}{9.7 \pm 3.8}$	$\frac{141.0 \pm 13.9^*}{216.3 \pm 21.9}$
Объем клетки мезофилла, тыс. мкм <sup>3</sup>	– **	– **	$\frac{9.9 \pm 0.7^*}{15.4 \pm 0.7}$	$\frac{7.0 \pm 0.5^*}{12.9 \pm 0.7}$	$\frac{53.1 \pm 10.6}{51.4 \pm 9.0}$	$\frac{33.2 \pm 6.2^*}{3.8 \pm 0.62}$	$\frac{89.0 \pm 10.0}{92.1 \pm 10.4}$
Объем хлоропласта, мкм <sup>3</sup>	$\frac{12.0 \pm 1.0}{10.8 \pm 0.9}$	$\frac{30.3 \pm 2.9^*}{18.2 \pm 1.5}$	$\frac{51.3 \pm 3.6^*}{58.5 \pm 3.0}$	$\frac{54.9 \pm 3.2}{55.4 \pm 2.5}$	$\frac{24.8 \pm 2.9}{22.9 \pm 1.9}$	$\frac{13.8 \pm 2.5^*}{22.8 \pm 1.8}$	$\frac{9.6 \pm 3.1^*}{24.5 \pm 4.7}$
Количество хлоропластов на клетку, шт.	$\frac{62.8 \pm 3.7^*}{50.6 \pm 3.8}$	$\frac{9.0 \pm 0.4}{8.3 \pm 0.5}$	$\frac{15.1 \pm 1.0^*}{21.0 \pm 2.3}$	$\frac{13.2 \pm 1.1}{11.8 \pm 0.8}$	$\frac{16.3 \pm 1.0^*}{22.4 \pm 1.2}$	$\frac{31.6 \pm 2.9^*}{19.8 \pm 2.0}$	$\frac{28.1 \pm 2.8}{29.7 \pm 3.2}$

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

\*\* Мезофилл отсутствует, т.к. листовая пластинка состоит из двух слоев клеток при  $p < 0.05$

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

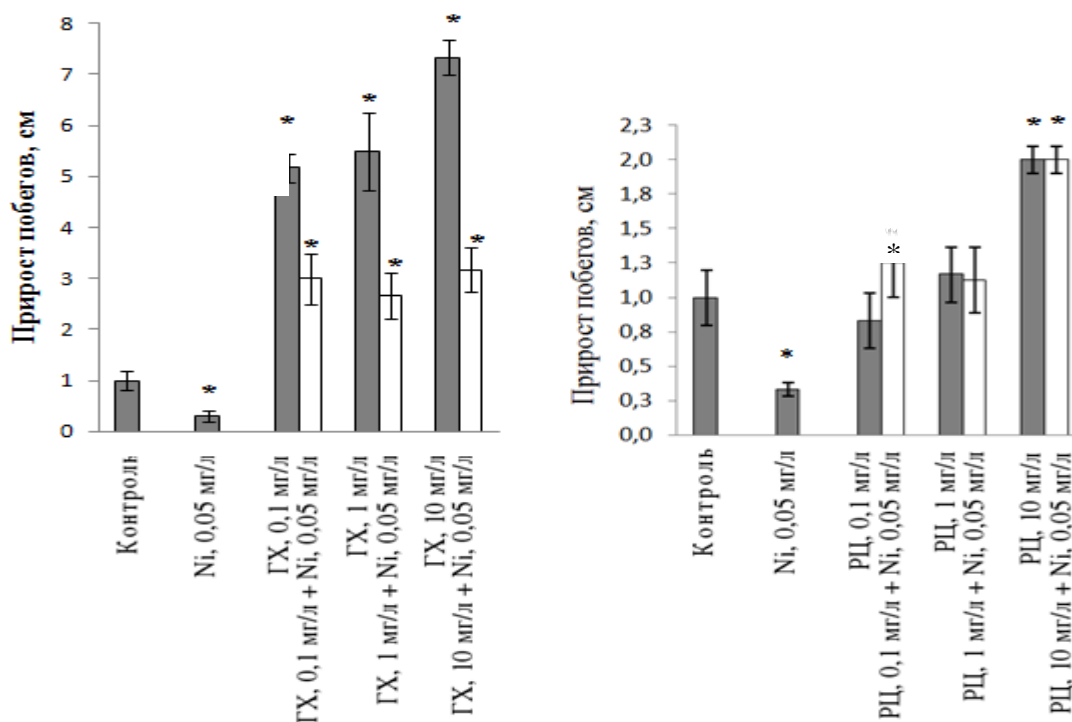
### 3.1.5. Изменение параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата водных макрофитов при совместном действии фенолов и тяжелых металлов

Известно, что многие ТМ, действуя одновременно с другими веществами, в том числе с ФС, могут проявлять эффекты синергизма и антогонизма, способны образовывать в окружающей среде более токсичные промежуточные продукты. Данные процессы в настоящее время присутствуют повсеместно в связи с комплексным загрязнением природной среды (Федорова, Яндыганов, 2003). Несмотря на пристальное внимание ученых к различным аспектам этой проблемы, совместное действие ТМ и ФС остается нераскрытым. (Кислицина, Борисова, 2012). В связи с этим, в настоящем исследовании представлены данные сравнительного изучения мезоструктуры листьев *E. densa*, инкубированной в присутствии гидрохинона, резорцина (в концентрациях 0,1; 1 и 10 мг/л) и сульфата никеля (0,05 мг/л в пересчете на  $Ni^{2+}$ ). Никель и ФС являются приоритетными загрязнителями окружающей среды в ряде регионов Российской Федерации (Государственный доклад..., 2014). Основные источники поступления никеля в биосферу – цветная и черная металлургия, сжигание нефти и бензина, производство фосфатных удобрений и др. (Лукин, 2011; Поклонов, 2016).

Установлены изменения анатомо-морфологических характеристик побегов и листьев *E. densa* в присутствии органических и неорганических загрязнителей. Было отмечено, что все комбинации гидрохинон+никель приводили к снижению прироста побегов по сравнению с вариантами без никеля. В вариантах резорцин+никель изменения прироста побегов по сравнению с вариантами без никеля не обнаружено (рис. 28).

Следует отметить, что ранее было отмечено подобное влияние *o*- и *p*-диоксифенолов на рост *E. canadensis* (Кирсо, 1988). Нами также обнаружено рост стимулирующее влияние *m*-диоксифенола (резорцина), на примере *E. densa*.





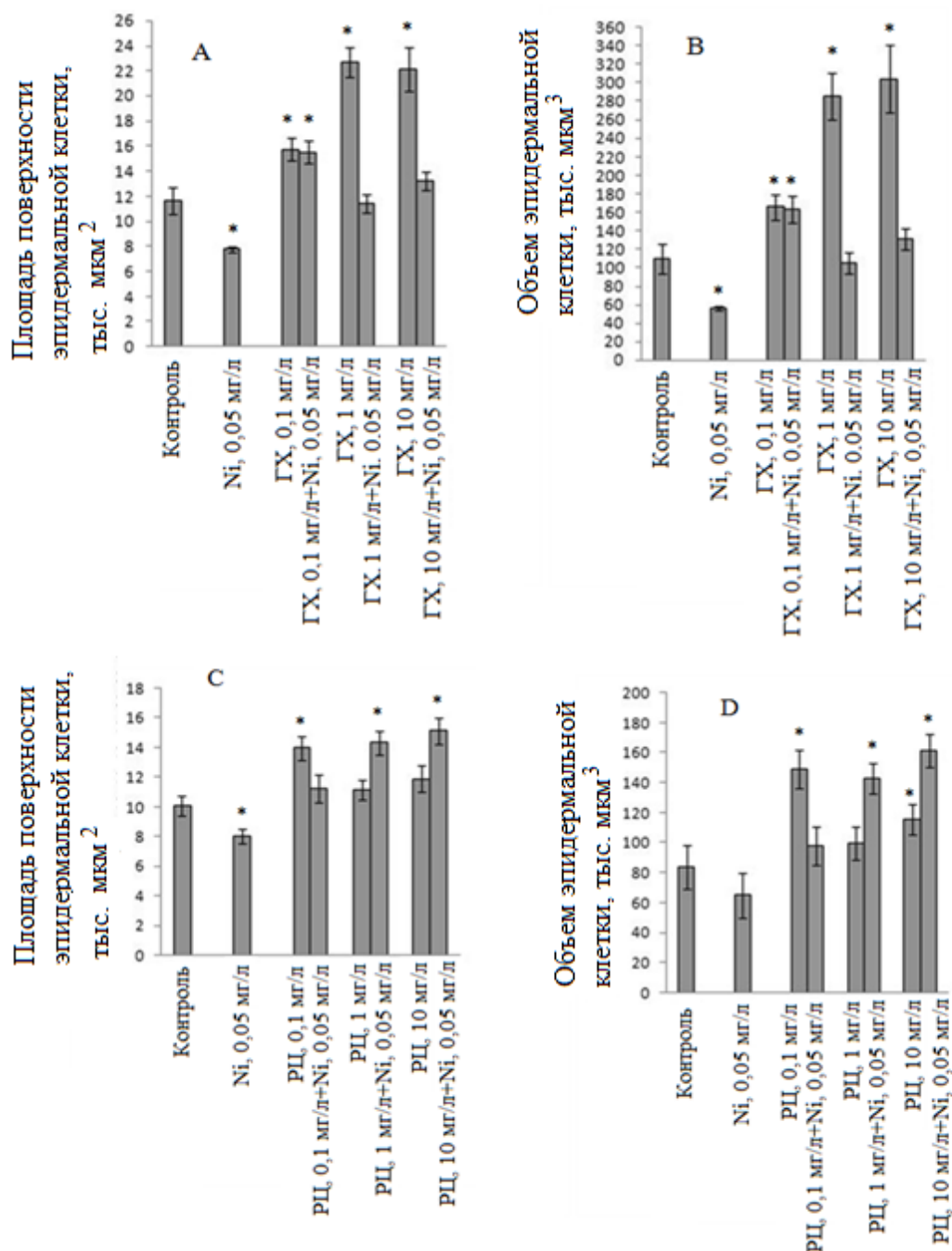
\* достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$

**Рис. 28. Прирост побегов *E. densa* при совместном действии гидрохинона и никеля (А) и резорцина и никеля (В).**

Толщина листа *E. densa* в контрольном и опытных вариантах не изменялась. Вероятно, это обусловлено анатомическими особенностями данного вида: листовая пластинка состоит из двух слоев клеток, что делает невозможным изменение толщины листа за счет количества клеток. Неизменность толщины листовой пластинки, возможно, связана и с экологическим приспособлением эгерии для поддержания оптимального уровня газообмена и фотосинтеза в толще воды.

Площадь поверхности и объем клеток *E. densa*, инкубированной в среде с  $\text{Ni}^{2+}$  (0,05 мг/л) без добавления фенолов уменьшались по сравнению с контролем. Гидрохинон и резорцин в различных концентрациях, напротив, вызывали увеличение площади поверхности и объема клеток по сравнению с контролем. Но при инкубировании эгерии в присутствии гидрохинона и  $\text{Ni}^{2+}$  при концентрации гидрохинона 1 мг/л и 10 мг/л, происходило снижение площади поверхности и объема клеток эгерии по сравнению с вариантами без ионов никеля. При комбинации резорцин, 0,1 мг/л+никель площадь

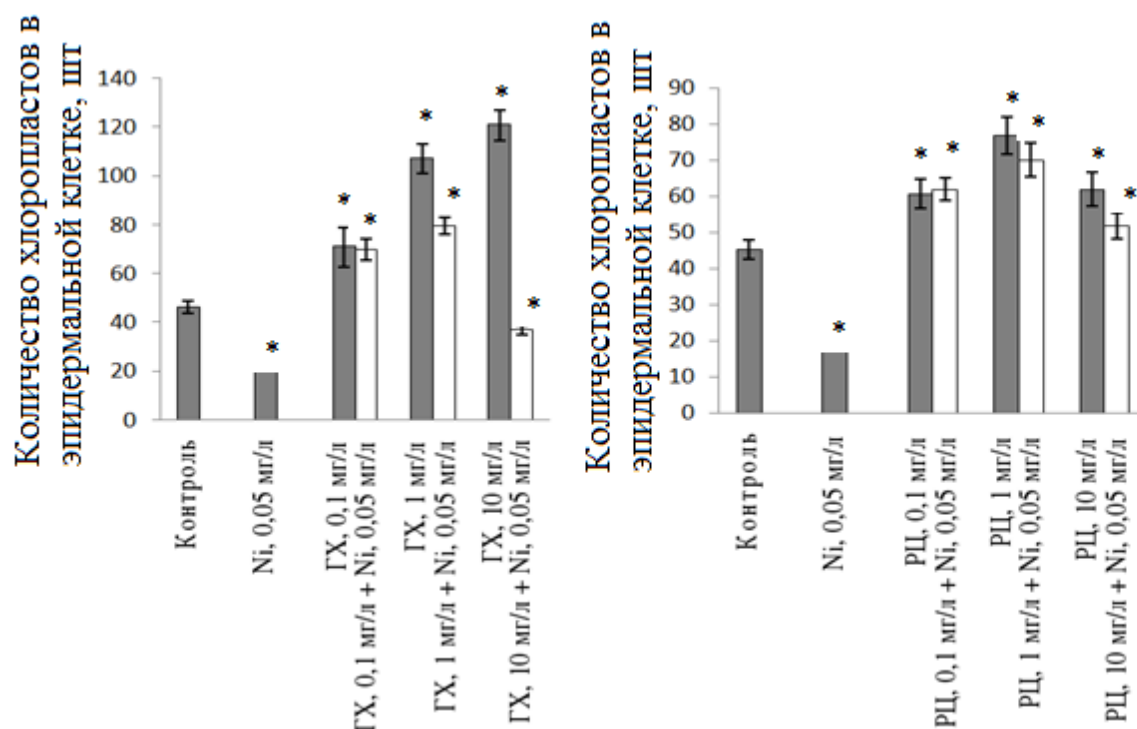
поверхности и объем клеток были меньше, по сравнению с вариантом, где резорцин в концентрации 0,1 мг/л находился без  $Ni^{2+}$ . В то же время, с возрастанием концентрации резорцина (при 1 мг/л и 10 мг/л) при его действии совместно с  $Ni^{2+}$  происходило увеличение площади и объема клеток *E. densa* (рис. 29 C, D).



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

Рис. 29. Площадь поверхности и объем клеток *E. densa* при совместном действии гидрохинона (ГХ) и никеля (А и В), резорцина (РЦ) и никеля (С и D).

Сравнительный анализ параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата *E. densa* показал, что количество хлоропластов в клетках возрастало с увеличением концентрации как гидрохинона, так и резорцина. Однако в вариантах с резорцином количество хлоропластов возрастало лишь при концентрациях 0,1 и 1 мг/л. При концентрации 10 мг/л возрастания количества хлоропластов не происходило. При инкубировании эгерии в среде гидрохинон-никель (при концентрации гидрохинона 1 мг/л и 10 мг/л) происходило снижение количества хлоропластов по сравнению с вариантами без никеля (рис. 30). Комбинация резорцин+никель приводила к незначительному снижению количества хлоропластов только при максимальной концентрации резорцина – 10 мг/л.



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

**Рис. 30. Количество хлоропластов в клетках *E. densa* при совместном действии дифенолов и никеля.**

Что касается параметров хлоропластов в клетках (площадь поверхности, объем) и толщины листа *E. densa*, то отчетливых тенденций обнаружено не было, ни в вариантах с гидрохиноном, ни в вариантах с резорцином.

Таким образом, данные свидетельствуют о том, что *E. densa* обладает способностью успешно противостоять действию таких загрязнителей, как гидрохинон и резорцин за счет изменения анатомо-морфологических параметров.

Резорцин и гидрохинон способны ослаблять токсическое действие никеля, что проявляется в увеличении прироста побегов, площади и объема клеток, количества хлоропластов в клетках, когда данные поллютанты находятся в комбинации с никелем.

Изучение анатомо-морфологических показателей гидрофитов в связи с антропогенным загрязнением представляется важным для выявления видов, обладающих повышенными адаптивными возможностями. Исследования в данном направлении дают научную основу для более эффективного использования высших растений в целях биологического мониторинга и фиторемедиации загрязненных водных объектов.

### **3.2. Физиолого-биохимические особенности водных макрофитов при действии фенольных соединений**

ФС представляют особую опасность среди компонентов сточных вод различных производств из-за широкой распространенности, токсичности и трудности очистки (Грушко, Кожова, 1978). Характер биологической активности экзогенных фенолов разнообразен (Кирсо и др., 1988). Многие фенолы при совместном воздействии с другими веществами или ФС способны проявлять эффект синергизма (Кислицина, Борисова, 2010). Загрязнение фенолами чрезвычайно губительно отражается на обитателях водной среды и растительности (Моисеенко, 2009). По мере увеличения фенольного загрязнения водоемов все более остро ощущается необходимость сведений о вкладе водных организмов в устранение или обезвреживание фенолов и о резистентности к ним гидробионтов (Кирсо и др., 1988).

В связи с этим, в данной главе предпринята попытка рассмотреть физиологические реакции водных макрофитов на действие ФС, а также

прояснить их роль в обеспечении устойчивости к фенолам, опираясь на физиологические методы исследований.

Учитывая тот факт, что водные макрофиты способны поглощать из водной среды экзогенные фенолы, нами были проведены исследования по изучению активности ДФО и ГП – ферментов водных макрофитов, принимающих участие в метаболической трансформации и обезвреживании ФС. Уделено большое внимание изучению АОС водных макрофитов, поскольку это одна из важнейших систем, ответственных за предотвращение и устранение окислительного стресса в клетках растений.

Среди составляющих АОС растений принято выделять ферменты антиоксиданты, низкомолекулярные и макромолекулярные неферментативные компоненты (Методы оценки..., 2012). В данном исследовании в большей или меньшей степени уделено внимание каждой группе компонентов, слагающих АОС водных макрофитов.

При исследовании адаптивных возможностей растений большое значение имеет изучение пластичности фотосинтетического аппарата, его способности приспосабливаться к изменяющимся внешним условиям (Чукина, 2010; Винокурова, 2015;). В связи с этим была проведена оценка влияния фенолов на фотосинтетический аппарат водных макрофитов из природной среды обитания, подверженной фенольному загрязнению, а также в моделируемых условиях.

Описанные в этой главе данные вносят вклад в имеющуюся информацию о механизмах токсического действия ФС на водные макрофиты и проливают свет на механизмы устойчивости растений, позволяющие им длительное время существовать в условиях фенольного загрязнения.

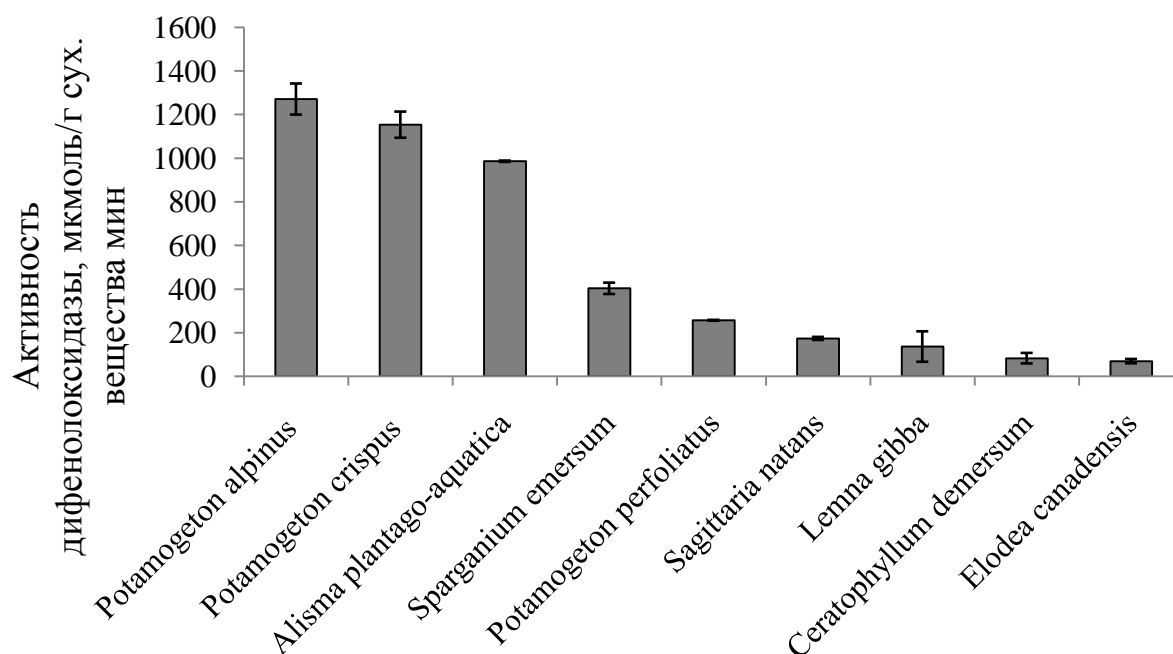
### **3.2.1. Активность дифенолоксидазы в листьях водных макрофитов**

В условиях загрязнения водных экосистем у водных макрофитов формируются защитные механизмы, благодаря которым ограничивается проникновение поллютантов в клетку, либо осуществляется их детоксикация. Детоксикации поллютантов способствует активация ряда ферментов, в том

числе ДФО, которая катализирует окислительную трансформацию ФС (Кислицина, Борисова, 2012).

Способность водных макрофитов к использованию собственных ферментных систем для детоксикации ФС послужило предпосылкой для проведения сравнительного анализа активности ДФО в листьях разных видов макрофитов, взятых из незагрязненных фенолами мест обитания: р. Сысерть и р. Ляля (выше производственных стоков НЦБК). Результаты определения активности ДФО приведены на рис. 31.

Как видно из представленных данных, активность ДФО может варьироваться в широких пределах. Максимальные значения активности фермента обнаружены в листьях *P. alpinus*, минимальные значения – в листьях *E. canadensis*. Представленные данные свидетельствуют о том, что степень активности ДФО – видоспецифичный показатель, определяемый конкретным видом растения.



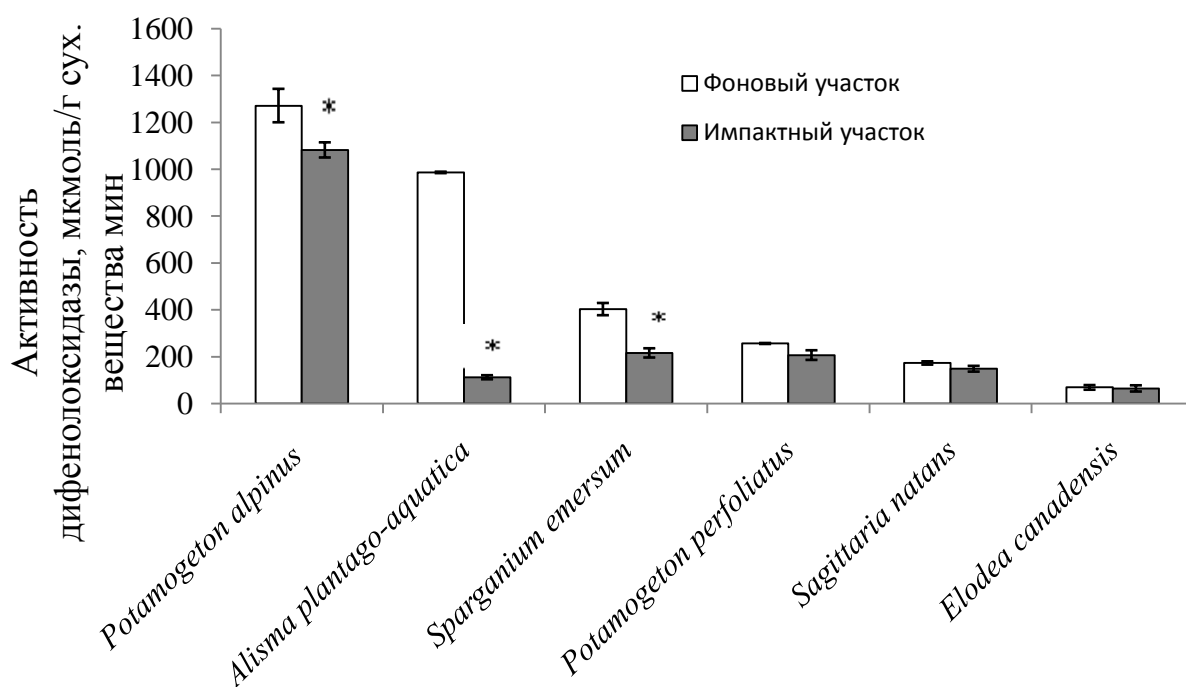
**Примечание:** *L. gibba*, *C. demersum* и *P. crispus* из р. Сысерть, все остальные растения из р. Ляля

**Рис. 31. Активность дифенолоксидазы в листьях водных макрофитов**

Для того, чтобы проверить, как изменяется активность ДФО при наличии фенольного загрязнения, нами было проведено исследование

активности данного энзима в листьях водных макрофитов из р. Ляли, которая характеризуется разной степенью загрязнения фенолами.

Анализ активности ДФО в листьях водных макрофитов из разных участков реки показал, что, в большинстве случаев, активность энзима снижалась в листьях растений из загрязненного участка реки (рис. 32). Это говорит о высокой чувствительности данного фермента к наличию в среде ФС. В частности, активность ДФО в листьях *A. plantago-aquatica* из импактного участка реки снижалась в 8,8 раз по сравнению с фоновым участком. Это свидетельствует о том, что активность ДФО может изменяться в значительных пределах. Возможные причины снижения активности ДФО будут рассмотрены в разделе 3.2.1. Следует отметить, что в ранее проведенных исследованиях активности ДФО в листьях одного и того же вида водных макрофитов из водных объектов, различающихся степенью загрязнения поллютантами не фенольного происхождения, было показано отсутствие достоверных различий по активности ДФО (Кислицина, 2012). В связи с этим, исследование активности ДФО у водных макрофитов из природной среды обитания, загрязненной фенолами, позволяет получать данные, преимущественно отражающие действие именно ФС и минимизировать возможное действие на активность фермента других факторов.



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

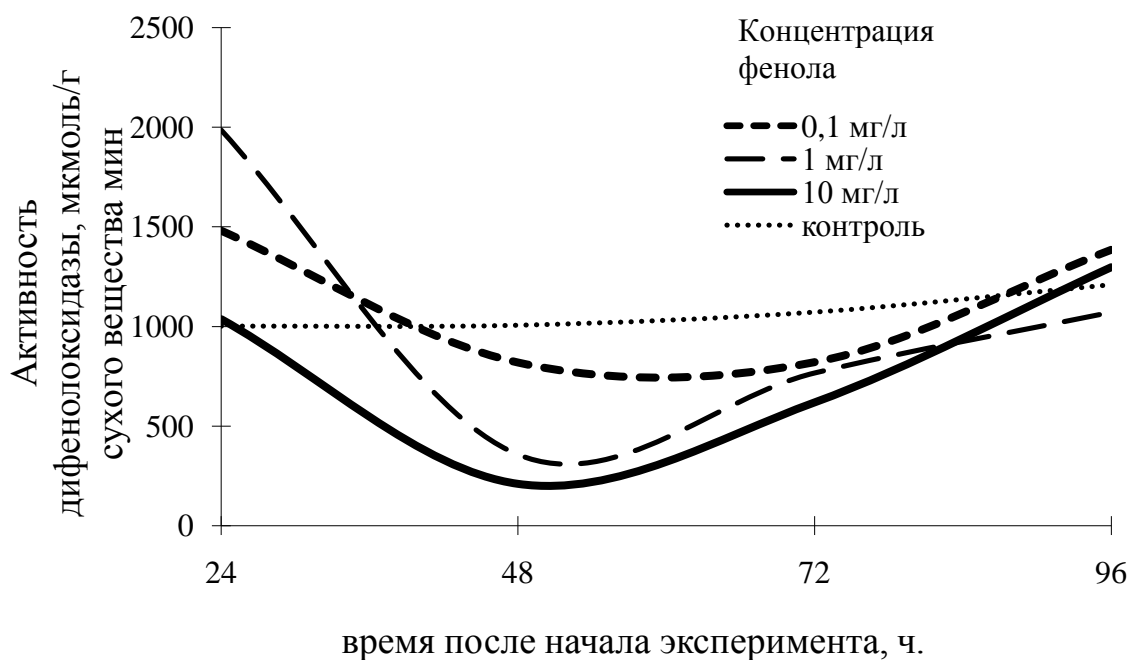
**Рис. 32. Активность дифенолоксидазы в листьях водных макрофитов из фонового и импактного участков р. Ляля**

Сопоставление активности ДФО в листьях водных макрофитов показало, что наибольшей активностью этого фермента отличался *P. alpinus* и *P. crispus*. Вероятно, высокая активность ДФО позволяет данным растениям осуществлять детоксикацию и метаболизацию ФС быстрее, по сравнению с растениями, обладающими низкой активностью фермента. Растения, обладающие высокой активностью ДФО, представляют большой интерес в технологиях очистки сточных вод от ФС. Для того, чтобы выяснить, как меняется активность ДФО при наличии в среде различных концентраций ФС, был проведен модельный эксперимент, в котором мы проследили изменение активности ДФО в листьях *P. crispus* в течение четырех дней экспозиции с монофенолом в концентрации 0; 0,1; 1 и 10 мг/л.

На рис. 33 показано, что при всех концентрациях монофенола *P. crispus* испытывал эустресс. В течение 48 часов после начала экспозиции у *P. crispus* наблюдалась первичная индуктивная стрессовая реакция, которая проявлялась в снижении активности ДФО (в среднем по вариантам опыта на



57%). В последующие часы инкубирования было отмечено увеличение активности фермента, что свидетельствует о наступлении стадии адаптации *P. crispus* к действию фенола.



**Рис. 33. Динамика изменения активности дифенолоксидазы в листьях *P. crispus* при различных концентрациях фенола**

Следует отметить, что даже инкубирование растений при концентрации фенола 10 мг/л, в 1000 раз превышающей величину их ПДК для водных объектов рыбохозяйственного назначения, в течение 4 дней экспозиции не привело к ингибированию ДФО, а напротив, сопровождалось увеличением активности фермента на 20% по сравнению с контролем. Это свидетельствует о хорошем фиторемедиационном потенциале данного вида для использования в технологиях очистки фенолсодержащих сточных вод.

### **3.2.2. Физиолого-биохимические особенности водных макрофитов из природных местообитаний с разной степенью фенольного загрязнения**

Растительная клетка – активный продуцент АФК, образование которых является нормой (Полесская, 2007). Под действием различных неблагоприятных факторов среды образование АФК может существенно возрастать. Сверхпродукция АФК способна приводить к окислительному стрессу. Известно, что активация процессов перекисного окисления липидов

(ПОЛ) – одна из возможных ответных реакций растений на стрессовое воздействие.

В результате исследования процессов пероксидации липидов установлено, что интенсивность ПОЛ в листьях всех растений, взятых из импактного участка реки Ляля, варьировала, но была существенно выше по сравнению с фоновым. Исключение составила *E. canadensis*, в листьях которой достоверных различий по показателю ПОЛ не обнаружено (таблица 9) (Кислицина, Борисова, 2015).

Увеличение интенсивности ПОЛ в листьях растений из импактного участка реки может свидетельствовать о том, что процесс антиоксидантной защиты и метаболической биотрансформации поллютантов, в том числе фенольной природы, у большинства изучаемых растений замедлен. Усиление липопероксидации могло произойти вследствие нарушения работы антиоксидантной системы растений, ответственной за обезвреживание активных форм кислорода, а также в результате нарушения работы систем, связанных с метаболизацией токсичных соединений, попадающих в растительный организм (Кислицина, Борисова, 2015).

## 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	0,41 ± 0,11	0,01±0,00 *	0,06±0,01 *	0,09±0,04 *	0,01±0,00 *
	0,44 ± 0,10	0,13±0,06	0,74±0,02	0,28±0,06	0,80±0,03
Активность гваякол-специфичной пероксидазы, мМ/г сухой массы•мин	0,70±0,03 *	2,35±0,02 *	3,04±0,18 *	2,95±0,11 *	0,54±0,10 *
	0,82±0,04	1,96±0,17	1,92±0,10	1,61±0,00	3,26±0,25
Активность дифенолоксидазы, мкМ/г сухой массы •мин	69,24±9,89	256,50±0,00 *	403,17±26,02 *	173,33±6,93 *	986,10±0,00 *
	64,80±13,23	207,00±20,62	216,33±19,67	148,75±12,27	112,45±8,65
Содержание флавоноидов, мг/г сухой массы	65,27±5,49 *	22,82±1,17 *	48,80±1,37	60,59±1,20 *	74,74±1,19 *
	79,29±2,29	18,84±0,83	46,87±4,77	74,84±2,26	63,16±3,90
Содержание растворимого белка, мг/г сухой массы	222,95±2,88	102,46±3,23	213,94±5,23 *	148,86±4,33 *	170,82±0,91 *
	205,41±12,01	103,09±2,76	232,39±7,21	169,98±2,05	205,15±10,41
Содержание водорастворимых АО, мг/г сухой массы	1,40±0,18	4,22±0,13 *	6,03±0,19 *	3,17±0,42	4,93±0,37
	1,45±0,14	3,69±0,07	8,58±0,26	3,12±0,14	4,93±0,09
Содержание свободного пролина, мкМ/г сухой массы	5,52±0,13 *	2,46±0,02	6,07±0,37	5,55±0,27 *	11,77±0,42 *
	4,87±0,16	2,59±0,09	6,86±0,50	4,40±0,10	4,70±0,11
Содержание аскорбата, мкМ/г сухой массы	13,11±0,28 *	4,33±0,01 *	23,36±1,38 *	15,74±0,12 *	17,90±0,44 *
	10,70±0,18	5,11±0,03	15,34±0,21	11,96±0,08	14,63±0,82

**Примечание.** Над чертой – фоновый участок, под чертой – импактный.

\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0,05$

Устойчивость к окислительным повреждениям во многом обусловлена функционированием АО системы. Наиболее удобно характеризовать группы антиоксидантов в зависимости от их молекулярных масс (Кения и др., 1993). Высокомолекулярные АО в основном представлены ферментами, неферментативными белками и пептидами, к низкомолекулярным – относятся аскорбат, глутатион, некоторые аминокислоты, флавоноиды и др. (Меньщикова, Зенков, 1993; Полехина, Павловская, 2013). Как правило, более высокая антиоксидантная активность клеток коррелирует с более высокой устойчивостью к стрессу (Деви, Прасад, 2005).

ГП – важный регулятор прооксидантных реакций в клетках живых организмов. Фермент катализирует реакции, в которых пероксидный радикал участвует в окислении ФС. Субстратом для окисления могут быть не только эндогенные соединения растений, но и экзогенные фенолы. Этот факт позволяет рассматривать ГП с двух позиций: как фермент, принимающий участие в окислении органических ксенобиотиков, в том числе фенолов, и как фермент-антиоксидант, ликвидирующий пероксиды (Квеситадзе и др., 2005).

Как показали результаты наших исследований, активность ГП в листьях *P. perfoliatus*, *S. natans* и *S. emersum* из импактной зоны была ниже по сравнению с фоновой на 16, 45 и 37% соответственно. В листьях *A. plantago-aquatica* она превышала фоновые значения на 83%. У *E. canadensis* существенного изменения активности ГП не зарегистрировано. Вероятно, из-за пониженной активности фермента в клетках растений могло образоваться избыточное количество  $H_2O_2$  и, как следствие, возник окислительный стресс с последующим разрушением липидного бислоя мембран.

Активность ДФО была достоверно ниже во всех растениях из импактного участка реки, за исключением *E. canadensis*, у которой прослеживалась лишь тенденция к незначительному снижению активности

фермента. Особенно низкая активность ДФО обнаружена у *A. plantago-aquatica* – на 97% ниже по сравнению с фоновым участком.

Снижение активности ДФО в листьях растений из импактного участка русла свидетельствует о замедленном окислении фенольных соединений, присутствующих в большом количестве в сточных водах ЦБК. Возможно, это связано с субстратным ингибированием ДФО. Такой результат согласуется с литературными данными о том, что ДФО может быть ингибирована продуктами окисления субстрата – хиноном (Wood, Ingraham, 1965). Замедленная метаболическая биотрансформация экзогенных фенолов могла привести к их накоплению в тканях растений. Обладая токсическим действием, фенолы могли ускорить прооксидантные реакции растений. С другой стороны, снижение активности ДФО в условиях фенольного загрязнения можно рассматривать и как адаптивную реакцию водных макрофитов. Это объясняется тем, что многие не окисленные фенолы обладают меньшей токсичностью по сравнению с продуктами, образующимися в процессе окисления (Кирсо и др., 1988). Поэтому замедленная биотрансформация фенолов, достигаемая снижением активности ДФО, вероятно, вполне оправданный механизм устойчивости водных макрофитов к появлению в клетках еще более опасных продуктов окисления ФС.

Известно, что при окислительном стрессе ферментативная АОС может становиться менее эффективной (Половникова, 2007). Причины этого – быстрая инактивация конститутивного пула ферментов свободными радикалами, значительное время, необходимое для индукции их синтеза. В этом случае возрастает роль неферментативных АО (Кения и др., 1993).

Количественное содержание белков принято считать показательным параметром в исследованиях токсических реакций и процессов адаптации (Мурзин и др., 2010). Белки играют важную роль в обмене веществ, определяют структуру и функцию каждой клетки, выполняют внешние и внутренние защитные функции (Якубке, Ешкайт, 1985).

Содержание растворимого белка в листьях *E. canadensis* и *P. perfoliatus* из импактного участка русла не изменялось, тогда как в листьях *S. emersum*, *S. natans*, *A. plantago-aquatica* белка было больше на 8–17%. Очевидно, увеличение содержания белков в листьях растений из загрязненного участка реки обусловлено их защитной функцией, а также необходимостью «корректировки» процессов метаболизма растений в условиях загрязнения.

Содержание свободного пролина в листьях *E. canadensis* и *S. natans* было немного меньше по сравнению с его содержанием в листьях аналогичных растений из фонового участка. Наиболее сильно содержание пролина отличалось у *A. plantago-aquatica*. В листьях этого растения из импактного участка реки содержание пролина было ниже на 60 % по сравнению с фоновым участком. Как правило, накопление пролина при стрессе является типичным ответом растений на стрессовое воздействие (Гунес и др., 2009). Это обусловлено многофункциональной ролью пролина в растительном организме. В условиях стресса пролин выступает в качестве низкомолекулярного шаперона (Гринин и др., 2010), участвует в обезвреживании АФК, вовлекается в регуляцию экспрессии стресс-контролируемых генов, поддерживает клеточный рН-стат (Кузнецов, Шевякова, 1999). Снижение содержания пролина в некоторых растениях из импактного участка реки не отрицает возможного участия этой аминокислоты в обеспечении устойчивости водных макрофитов к действию фенолсодержащих сточных вод. *A. plantago-aquatica* среди изученных растений обладает наиболее мощной корневой системой. Это указывает на то, что роль корневой системы данного вида в поглощении питательных веществ достаточно велика. В связи с этим не исключается и тот факт, что главной мишенью токсического действия поллютантов являются корни *A. plantago-aquatica*. В этом случае могло иметь место межорганное перераспределение пролина. Кроме того, снижение содержания свободного пролина может свидетельствовать о том, что пролин был включен в состав белков и пептидов, участвуя в процессах конъюгации ФС.

Содержание водорастворимых АО в листьях *P. perfoliatus* из импактного участка реки было на 12% меньше, чем в листьях данного растения из фонового участка. В листьях *S. emersum*, напротив, из загрязненного участка реки АО было больше на 30%. В остальных растениях достоверных отличий не обнаружено. Вероятно, отсутствие общей закономерности в содержании водорастворимых АО можно объяснить выработкой различных адаптивных стратегий водных макрофитов к существованию в загрязненной среде обитания. В частности, способность растений к накоплению АО обуславливается не только действием внешних раздражителей, вызывающих окислительный стресс, но во многом зависит от видовой принадлежности растения. Известно, что виды с повышенной аккумулятивной способностью характеризуются высоким антиоксидантным статусом, что выражается в повышенной активности АО ферментов и высоком содержании в листьях низкомолекулярных АО. Напротив, для видов с невысокой способностью к аккумуляции большую роль в адаптации к условиям среды играют защитные механизмы, предотвращающие проникновение поллютантов (Чукина, 2010).

Содержание флавоноидов в листьях растений из загрязненного участка реки было выше, чем из незагрязненного у *E. canadensis*, *S. natans* и *A. plantago-aquatica*. Флавоноиды способны предотвращать пероксидацию липидов путем нейтрализации активных форм кислорода (Rise-Evans, Packer, 1997) и стабилизации липидного бислоя мембран (Ягольник, Махмутов, 2013). Их накопление служит механизмом защиты от обширного окислительного повреждения растений при стрессовых воздействиях (Запрометов, 1993). Возрастание содержания флавоноидов у некоторых исследованных растений из импактной зоны, вероятно, связано с проявлением защитной функции флавоноидов. Защитный механизм заключается в способности флавоноидов отдавать атом водорода из ОН-группы ароматического кольца для тушения и ликвидации свободных радикалов, окисляющих липиды и другие биомолекулы (Кретович, 1980). На

фоне пониженной активности ДФО и ПО возрастание содержания флавоноидов в растениях из импактного участка реки особенно значимо. Это связано с тем, что биосинтез флавоноидов – процесс, как известно, энергетически менее затратный, нежели повышение содержания того или иного узкоспециализированного фермента, обладающего ограниченным набором функций. Исходя из этого, растению энергетически выгодно синтезировать более универсальное “противоядие” для повышения адаптационных возможностей. Флавоноиды вполне подходят на эту роль в связи с многоплановостью их функций в растительном организме и возможностью синтезироваться фактически во всех клетках. Установлено их участие в формировании клеточных стенок, дыхании и фотосинтезе, т.е. важнейших систем жизнеобеспечения растений, без которых нормальное функционирование невозможно.

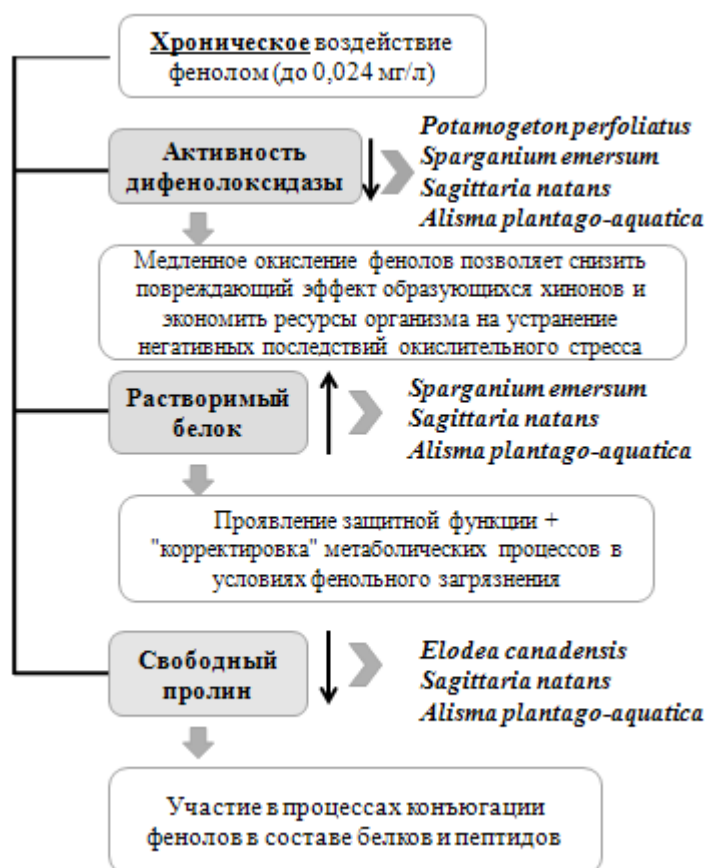
Содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений из импактного участка снижалось, за исключением *P. perfoliatus*, который отличался небольшим повышением содержания аскорбата. Во многих исследованиях был обнаружен подобный эффект: длительное воздействие поллютантами органической и неорганической природы приводило к снижению содержания аскорбиновой кислоты (Артюшенко, Гришко, 2010; Абрамова, Иванищев, 2012; Кригер и др., 2013). Известно, что ключевая роль в детоксикации  $H_2O_2$  в клетках растений принадлежит аскорбат-глутатионовому циклу, в котором с участием аскорбата и аскорбатпероксидазы происходит восстановление  $H_2O_2$  до воды. В растениях из импактного участка реки, вероятно, происходила интенсификация функционирования аскорбат-глутатионового цикла, что приводило к снижению пула восстановленного аскорбата при более интенсивном его окислении. В то же время нельзя не учитывать и возможный ингибирующий эффект поллютантов сточных вод ЦБК на активность ферментов метаболизма аскорбиновой кислоты.

Исследование физиолого-биохимических параметров водных растений в связи с действием на них сточных вод ЦБК показало, что все изученные



водные растения испытывали негативное действие сточных вод ЦБК в импактной зоне р. Ляля. Исключение составила *E. canadensis*, у которой не выявлено повышения уровня перекисидации липидов (табл. 9) и существенных изменений мезоструктуры листа (табл. 8).

На основании полученных результатов нами предложена схема, отражающая общие тенденции адаптивных реакций растений, произрастающих в условиях хронического фенольного загрязнения (рис. 34).



**Рис. 34. Физиолого-биохимические особенности водных растений, произрастающих в условиях постоянного фенольного загрязнения**

### **3.2.3. Физиолого-биохимические адаптации водных макрофитов в условиях фенольного загрязнения**

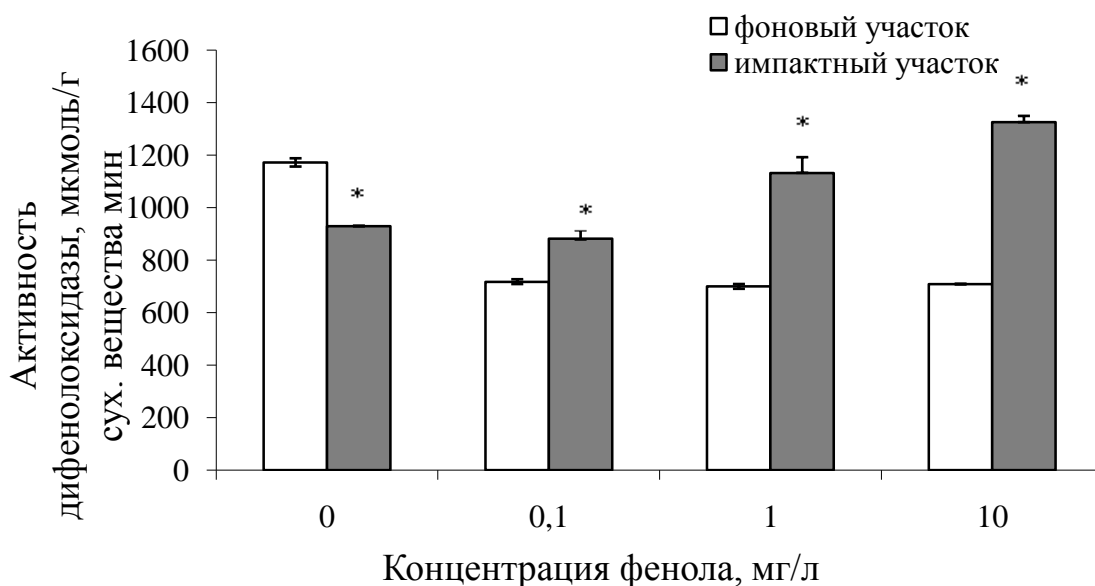
Большой интерес представляет проблема адаптации водных макрофитов к токсическому действию ФС. Как правило, содержание ФС в водоемах и водотоках в течение года изменяется неравномерно: оно подчинено сезонной динамике (Кумани и др., 2011) и наличию или

отсутствию эмиссий фенола. Активная адаптация водных макрофитов при залповом поступлении фенолов в среду обитания может выражаться в формировании защитных механизмов, обеспечивающих протекание метаболизма в неблагоприятных условиях. Результатом активной адаптации является расширение экологических границ жизни растения (Гаевский и др., 2012).

В связи с этим была изучена активность ферментов, принимающих участие в метаболизации ФС, а также содержание флавоноидов в листьях водных макрофитов, на примере *Sparganium emersum*. Для определения биохимических параметров использовали плавающие листья растений, отобранные выше и ниже производственных стоков НЦБК р. Ляля.

В наших исследованиях *S. emersum* был подвергнут воздействию дополнительных концентраций монофенола: 0,1; 1 и 10 мг/л.

В модельном эксперименте установлено, что активность ДФО в листьях *S. emersum* из импактного участка реки при всех концентрациях монофенола возрастала (рис. 35).

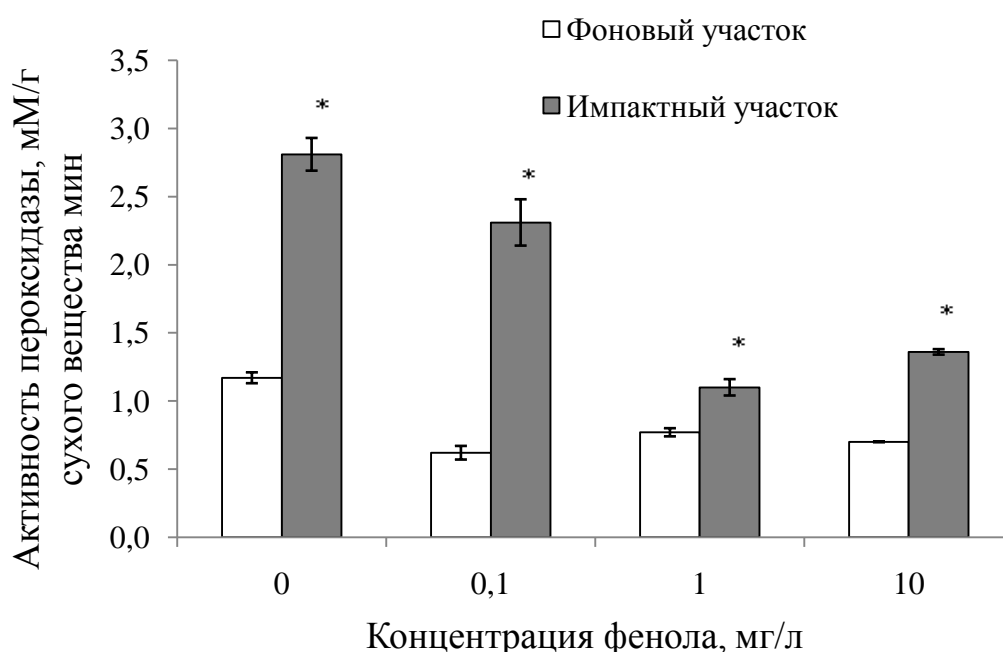


\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0.05$

**Рис. 35. Активность дифенолоксидазы в листьях *Sparganium emersum* из фонового и импактного участков р. Ляли при инкубировании с монофенолом**

Возрастание активности фермента в листьях растений из импактного участка реки свидетельствует о том, что *S. emersum* обладал лучшими детоксикационными способностями к фенолу после предварительной адаптации к его токсическому действию. Адаптация могла сформироваться в естественной среде обитания *S. emersum*, загрязненной ФС.

Исследование активности ГП показало, что активность этого фермента в листьях *S. emersum* из импактного участка реки была существенно выше по сравнению с фоновым участком при всех концентрациях монофенола (рис. 36).



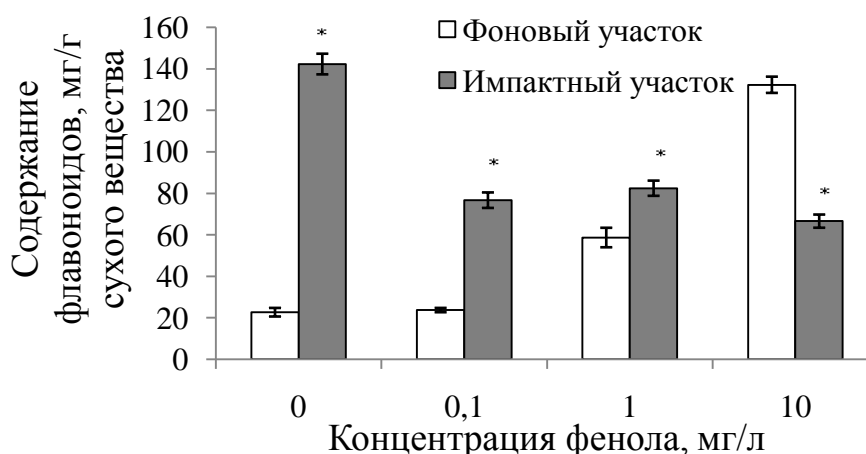
\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0.05$

**Рис. 36. Активность пероксидазы в листьях *Sparganium emersum* из фонового и импактного участков реки Ляли при инкубировании с монофенолом**

Известно, что ГП способна принимать участие в окислении органических ксенобиотиков, в том числе фенолов и функционировать как фермент-антиоксидант, ликвидирующий пероксиды (Квеситадзе и др., 2005). В этой связи, возрастание активности ГП представляется значимым

событием в повышении устойчивости *S. emersum* к токсическому действию фенола.

Содержание флавоноидов в листьях *S. emersum* из импактного участка реки при инкубировании с фенолом в концентрации 0,1 мг/л и 1 мг/л было выше по сравнению с листьями растений, инкубированных при тех же концентрациях фенола, но взятых из фонового участка реки (рис. 37). При концентрации фенола 10 мг/л содержание флавоноидов снижалось, что может быть связано с ингибирующим эффектом высоких концентраций фенола на активность ферментов биосинтеза флавоноидов или истощением пула флавоноидов при нейтрализации АФК. Известно, что флавоноиды в растениях при действии неблагоприятных факторов способны выполнять защитную функцию (Храмова и др. 2006). Более высокое содержание флавоноидов в листьях растений из импактного участка реки, вероятно, связано с тем, что растения за все время существования в естественной среде обитания, загрязненной фенолами, выработали устойчивость к токсическому действию данных загрязнителей. В частности, способность к накоплению флавоноидов, повышение активности ДФО и ГП в листьях иллюстрирует такие механизмы.

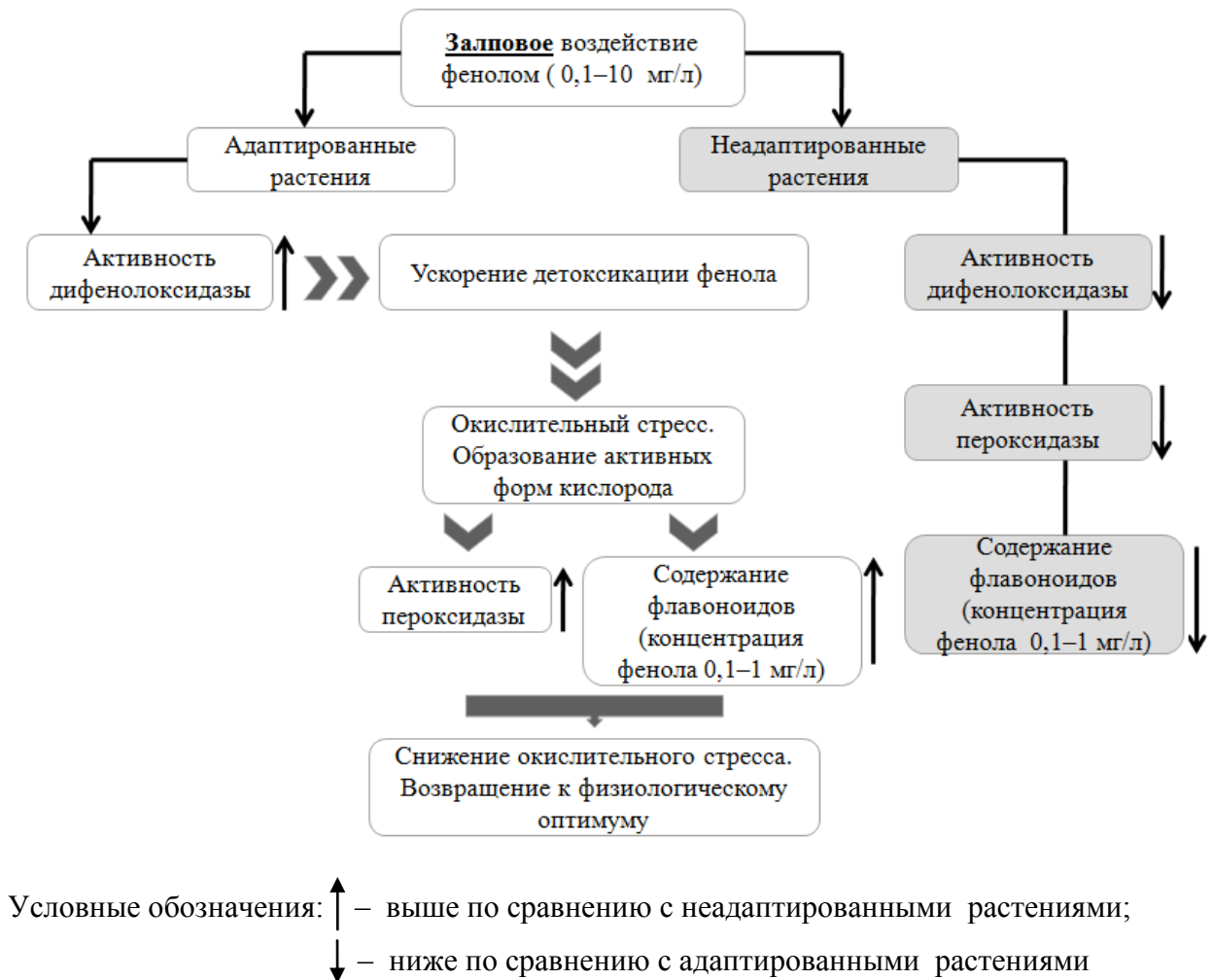


\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0.05$

**Рис. 37. Содержание флавоноидов в листьях *Sparganium emersum* из фонового и импактного участков реки Ляли при инкубировании с фенолом**

Таким образом, проведенные исследования показали, что водные макрофиты после адаптации к действию поллютантов обладали более высокими детоксикационными способностями к фенолу.

Данные результаты позволили предположить возможную схему влияния ФС на адаптированные и неадаптированные растения *Sparganium emersum* (рис. 38).



**Рис. 38. Физиолого-биохимические реакции *Sparganium emersum* к повышенным концентрациям монофенола**

### 3.2.4. Оценка способности водных макрофитов аккумулировать азот и фосфор в условиях фенольного загрязнения

На участке впадения в реку производственных стоков Новолялинского целлюлозно-бумажного комбината (НЦБК) масштаб техногенного воздействия очень велик. Показатели загрязнения превышают установленные

нормативы качества воды. Но в р. Ляля ниже хозяйственных и промышленных стоков (на расстоянии 4 км от места впадения промстоков) вследствие интенсивных процессов самоочищения, показатели загрязнения значительно ниже (Кислицина, Борисова, 2014).

Результаты анализа воды из р. Ляля, предоставленные лабораторией НЦБК, приведены в табл.10, 11.

Таблица 10

### Гидрохимические показатели р. Ляля в разных участках русла

Показатель	Питьевой водозабор	Промстоки НЦБК (выходящая вода)	р. Ляля ниже всех сбросов (промышленных и хозяйственных)	ПДК вредных веществ в водоемах, используемых для рыбохозяйственных целей
БПК <sub>20</sub> , мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	3,36	109,5	13,78	3
ХПК, мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	14,36	241,4	39,21	15-30
Хлориды, мг/дм <sup>3</sup>	2,11	8,22	3,03	300
Сульфаты, мг/дм <sup>3</sup>	11,06	43,19	16,41	100
Фосфаты, мг/дм <sup>3</sup>	0,019	0,019	0,028	0,2 (для эвтрофных водоемов)
Азот аммонийный, мг/дм <sup>3</sup>	0,457	0,866	0,698	0,5
Нитраты, мг/дм <sup>3</sup>	0,921	11,56	1,207	40

Таблица 11

### Содержание в воде компонентов токсического комплекса

Показатель	Питьевой водозабор	Промстоки НЦБК (выходящая вода)	р. Ляля ниже всех сбросов (промышленных и хозяйственных)	ПДК вредных веществ в водоемах, используемых для рыбохозяйственных целей, мг/л
Фенолы, мг/дм <sup>3</sup>	не обнаружено	0,052	0,010	0,001
Нефтепродукты мг/дм <sup>3</sup>	0,105	0,408	0,207	0,05
СПАВ мг/дм <sup>3</sup>	0,022	0,314	0,066	0,1

Основными загрязняющими веществами р. Ляля являются фенолы (10–52 ПДК), нефтепродукты (2,1–8,2 ПДК) и СПАВ (3,14 ПДК), среди биогенных элементов можно выделить аммонийный азот (1,4–1,7 ПДК). Следует отметить, что значения гидрохимических показателей в р. Ляля ниже промышленных и хозяйственных сбросов снижаются по сравнению с выходящей водой промстоков. Снижение концентрации токсических веществ связано с самоочищением реки при участии водной растительности. Известно, что водные растения способны поглощать значительное количество биогенных элементов, снижая тем самым уровень эвтрофикации водоемов, усваивать и перерабатывать различные химические соединения, способствовать осаждению взвешенных и органических веществ, определять газовый режим водоемов (Кислицина, Борисова, 2014).

Результаты исследований показали, что все изученные виды растений из импактного участка р. Ляля способны накапливать значительные количества биогенных элементов, в частности, азота (табл. 12) и фосфора (табл. 13), снижая, тем самым, степень эвтрофикации реки.

Таблица 12

**Содержание общего азота в растениях из  
фонового и импактного участков р. Ляля**

Участок сбора растений	<i>E. canadensis</i>	<i>P. perfoliatus</i>	<i>S. natans</i>	<i>S. sagittifolia</i>	<i>A. plantago- aquatica</i>
	% N от сухой массы				
Фоновый	4,53 ± 0,00	3,53 ± 0,00	4,25 ± 0,38	4,93 ± 0,10	5,27 ± 0,22
Импактный	5,25 ± 0,05*	4,05 ± 0,16*	5,43 ± 0,17*	6,29 ± 0,56*	6,44 ± 0,10*

\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0,05$

**Содержание общего фосфора в растениях из  
фонового и импактного участков р. Ляля**

Участок сбора растений	<i>E.</i> <i>canadensis</i>	<i>P.</i> <i>perfoliatus</i>	<i>S. natans</i>	<i>S.</i> <i>sagittifolia</i>	<i>A.</i> <i>plantago-</i> <i>aquatica</i>
	% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> от сухой массы				
Фоновый	1,29 ± 0,01	0,70 ± 0,12	1,42 ± 0,09	1,36 ± 0,04	1,91 ± 0,16
Импактный	1,34 ± 0,07	0,95 ± 0,06*	1,88 ± 0,07*	1,97 ± 0,07*	2,62 ± 0,03*

\* Различия между значениями показателя на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0,05$

Способность водной растительности к накоплению и использованию азота и фосфора благоприятствует поддержанию жизнедеятельности водной растительности в условиях загрязнения, что позволяет участвовать в процессах самоочищения реки не только от биогенных элементов, но и опасных фенольных соединений, нефтепродуктов, СПАВ (Кислицина, Борисова, 2014).

На участке реки Ляли ниже всех сбросов в местах с развитой водной и прибрежно-водной растительностью наблюдалось снижение содержания фенола и СПАВ в 5 раз, нефтепродуктов в 2 раза по сравнению с выходящей водой промстоков (Кислицина, Борисова, 2014).

Роль водных макрофитов в снижении содержания фенола в среде обитания, как правило, сводится к его поглощению с последующим выделением в атмосферу через устья и деструкции за счет наличия фенолоксиляющего фермента – дифенолоксидазы (Садчиков, Кудряшов, 2004). Разложение нефти и СПАВ – результат совместной деятельности гетеротрофных микроорганизмов и водных макрофитов. Первые выступают как основные деструкторы и минерализаторы загрязняющих веществ, а вторые – как индукторы, поглотители и потребители окисленных соединений. Функция индукции заключается в том, что прижизненные выделения водных растений (аминокислоты, углеводы, органические



кислоты, летучие амины, органический углерод и др.) являются стимулятором и питательной средой для СПАВ- и нефтеокисляющих микроорганизмов (Садчиков, Кудряшов, 2004; Шалбуев, 2010). Таким образом, высшие водные растения прямо и опосредованно участвуют в элиминации поллютантов из среды обитания. Их способность к накоплению, утилизации и трансформации многих токсических веществ делает их незаменимыми в общем процессе самоочищения водных объектов.

### **3.2.5. Изменение содержания фотосинтетических пигментов водных макрофитов в условиях фенольного загрязнения**

Воздействие токсикантов на водные макрофиты способно приводить к серьезным изменениям в строении их клеток, а также фотосинтезирующего аппарата (Винокурова, 2015; Чукина, 2010). Выживание растений в техногенно нарушенной среде возможно при их успешной адаптации к комплексу изменяющихся условий. При исследовании адаптивных возможностей растений большое значение имеет изучение пластичности фотосинтетического аппарата, его способности приспосабливаться к изменяющимся внешним условиям (Титова, 2010).

В связи с этим была проведена оценка влияния фенолов на фотосинтетический аппарат водных макрофитов из природной среды обитания, подверженной фенольному загрязнению, а также в моделируемых условиях с использованием в качестве тест-объекта *Egeria densa* Planch. Из природной среды обитания объектами исследования были погруженные (*Elodea canadensis*, *Potamogeton perfoliatus*, *Sagittaria natans*) и прибрежно-водные растения (*Sparganium emersum*, *Alisma plantago-aquatica*). Сбор растений производили в р. Ляля Свердловской области в окрестностях Новолялинского ЦБК из фонового и импактного участков.

В качестве воздействующих веществ в модельных экспериментах применяли монофенол и дифенолы (гидрохинон, пирокатехин, резорцин) в концентрации 1 мг/л. Контролем служили растения, инкубированные без добавления токсикантов. Определение содержания пигментов проводили

через 48 ч после начала эксперимента. Результаты определения фотосинтетических пигментов водных макрофитов из природных местообитаний представлены в таблице 14.

Степень функциональности фотосинтетического аппарата оценивают, как правило, по отношению хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* (*a/b*). Это отношение характеризует активность хлорофилла *a*: чем оно больше, тем интенсивнее фотосинтез. В норме у наземных растений этот показатель как правило соответствует 2,2–3,0 (Титова, 2010; Яцко, 2010). У водных растений отношение *a/b* характеризуется более низкими значениями (Новаковская, Дымова, 2012; Даниленко, Ольховик, 2014). Наши исследования показали, что отношение *a/b* у водных макрофитов варьировалось в диапазоне 1,57–2,2. Согласно Х. Лихтенталлеру (Lichtenthaler, 1987) снижение данного соотношения может свидетельствовать о перестройке ультраструктуры хлоропластов, при которой происходит увеличение доли тилакоидов стромы или гран. Возрастание доли хлорофилла *a* может свидетельствовать о превалировании тилакоидов стромы, а хлорофилла *b* – тилакоидов гран. Вероятно, под действием ФС также происходили изменения в ультраструктуре хлоропластов. Согласно нашим расчетам, доля хлорофиллов в ССК составляла 64–90% от общего фонда зеленых пигментов. Очевидно, высокая доля хлорофиллов в ССК погруженных и полупогруженных водных макрофитов объясняется экологической адаптацией исследованных растений к осуществлению ассимиляционной деятельности при дефиците света и недостатке CO<sub>2</sub>, имеющего низкий коэффициент диффузии в водной среде. Определенных закономерностей изменения доли хлорофиллов ССК в зависимости от степени загрязнения среды обитания водных макрофитов не обнаружено. Показано, что у отдельных видов растений из импактного участка реки по сравнению с фоновым участком доля хлорофиллов ССК может отличаться в большую (*A. plantago-aquatica*) или меньшую сторону (*S. natans*).

**Содержание фотосинтетических пигментов и их соотношение в водных макрофитах из фонового и импактного участков р. Ляля**

Параметр	<i>Elodea canadensis</i>	<i>Sparganium emersum</i>	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	<i>Sagittaria natans</i>	<i>Alisma plantago-aquatica</i>
Хлорофилл <i>a</i> , мг/г сухой массы	7.38±1.18	7.48±0.46 *	13.12±0.67	4.68±1.07 *	7.18±0.86
	8.97±1.08	5.83±0.56	13.20±0.88	9.96±0.92	7.60±0.77
Хлорофилл <i>b</i> , мг/г сухой массы	4.75±0.82	3.54±0.13	6.41±0.43 *	2.41±0.35 *	3.30±0.43 *
	6.10±0.91	3.05±0.37	7.57±0.38	4.52±0.54	4.43±0.49
Каротиноиды, мг/г сухой массы	1.28±0.45	2.38±0.23	3.30±0.78	2.20±0.61	2.37±0.36
	1.70±0.43	2.53±0.26	1.98±0.54	3.34±0.63	2.34±0.32
<i>a+b</i> , мг/г сухой массы	12.14±1.98	11.02±0.55 *	19.53±1.09	7.10±1.42 *	10.48±1.29
	15.07±4.89	8.88±0.93	20.77±1.00	14.48±1.45	12.02±1.26
Отношение <i>a/b</i>	1.57±0.09	2.11±0.09 *	2.05±0.04 *	1.90±0.18 *	2.19±0.03 *
	1.60±0.12	1.92±0.06	1.75±0.14	2.22±0.09	1.72±0.01
Отношение <i>a+b</i> /каротиноиды	9.63±0.36 *	4.63±0.10 *	6.04±0.51 *	3.19±0.12 *	4.39±0.25 *
	7.67±1.27	3.51±0.25	10.70±1.18	4.34±0.04	5.13±0.13
Доля хлорофилла в ССК, %	90.76±3.05	74.84±2.06	72.87±0.93	75.56±4.50 *	69.07±0.70 *
	90.33±1.42	76.95±1.58	73.10±4.17	64.68±1.95	80.06±0.44

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

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

Отношение хл  $(a+b)$ /каротиноиды играет не менее важную роль при характеристике работы фотосинтетического аппарата. Это соотношение в норме стабильно и очень чутко реагирует на изменения различных факторов среды (Титова, 2010; Яцко, 2010). Примечательно, что все изученные виды водных макрофитов из фонового и импактного участков реки наиболее сильно отличались именно по этому параметру, что еще раз подтверждает высокую чувствительность отношения хл  $(a+b)$ /каротиноиды и возможность использования для выявления определенных изменений в функционировании фотосинтетического аппарата. Уменьшение соотношения хл  $(a+b)$ /каротиноиды наблюдалось у *E. canadensis* и *S. emersum* из импактного участка. Это может свидетельствовать о снижении светособирающей способности пигментного комплекса под воздействием неблагоприятных условий. У остальных видов, напротив, происходило увеличение соотношения хл  $(a+b)$ /каротиноиды.

Анализ содержания зеленых пигментов макрофитов р. Ляля показал, что в условиях загрязнения фенолсодержащими стоками ЦБК у *P. perfoliatus*, *S. natans* и *A. plantago-aquatica* доля хлорофилла *b* возрастала. Содержание хлорофилла *a* было выше только у *S. natans* из импактного участка реки по сравнению с фоновым. У остальных видов растений содержание хлорофилла *a* не изменялось, а у *S. emersum* отличалось меньшими значениями. Увеличение содержания хлорофилла *b* у большинства видов растений, вероятно, связано с хроматической адаптацией фотосинтетического аппарата к неблагоприятным условиям существования. Следует отметить, что в импактном участке реки наблюдалась также повышенная цветность ( $160^\circ$ ) и низкая прозрачность воды (25 см), т.е. создавались условия затенения как для погруженных макрофитов, так и полупогруженных, листья которых находились частично или полностью в воде.

В условиях техногенной нагрузки возрастание содержания хлорофилла *b*, очевидно, способствовало усилению светособирающей функции

пигментного комплекса водных макрофитов. Хроматические адаптации фотосинтетического аппарата увеличивают способность водных макрофитов поглощать световую энергию и потенциально способны приводить к увеличению интенсивности фотосинтеза. Это, в свою очередь, способствует ускорению синтеза углеводов, которые при дыхании служат источником аденозинтрифосфорной кислоты, необходимой для обеспечения энергией процессов репарации в техногенно нарушенных условиях обитания.

Роль каротиноидов в процессах, имеющих прямые и косвенные связи с фотосинтезом, многогранна и различно трактуется исследователями (Винокурова, 2010). Они принимают участие в поглощении световой энергии, окислительно-восстановительных реакциях, предохраняют хлорофилл *a* от фотодеструкции, обладают антиоксидантной активностью (Ладыгин, 2000; Винокурова, 2010). Многими авторами было обнаружено повышение содержания каротиноидов в ответ на действие органических и неорганических поллютантов (Чукина, 2010; Винокурова, 2015). В наших исследованиях достоверных отличий в содержании каротиноидов в листьях растений из фонового и импактного участков реки отмечено не было.

Результаты модельного эксперимента позволили выявить эффекты краткосрочного воздействия (48 часов) на фотосинтетический аппарат водных макрофитов (на примере *E.densa*) отдельных загрязняющих компонентов фенолсодержащих сточных вод.

В исследовании были использованы наиболее распространенные в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности фенольные соединения: гидрохинон, резорцин, пирокатехин, монофенол в концентрации 1 мг/л. Контролем служили макрофиты, содержащиеся без добавления токсикантов. Результаты эксперимента, на примере *E.densa*, представлены в таблице 15.

Пирокатехин и монофенол в концентрации 1 мг/л не приводили к изменениям в содержании фотосинтетических пигментов *E. densa* по

сравнению с контролем. Гидрохинон и резорцин, напротив, оказали существенное воздействие на фотосинтетический аппарат эгерии.

Анализ содержания хлорофиллов после внесения фенолов в сосуды с растениями показал, что через 48 ч эксперимента, количество хлорофилла *a* в листьях *Egeria densa* возрастало в вариантах с гидрохиноном и резорцином на 20%, а хлорофилла *b* на 16–44%.

Реакция увеличения хлорофиллов, вероятно, обусловлена интенсификацией всех процессов в клетках, связанных с компенсацией травматического воздействия загрязнителей. Для того, чтобы противостоять стрессовым воздействиям, очевидно, что растению требуется больше энергии. Путем увеличения количества фотосинтетических пигментов растение эффективней ассимилирует солнечную энергию и, соответственно, расходует ее на формирование защитных механизмов.

Содержание каротиноидов возрастало в вариантах с гидрохиноном и резорцином на 75% по сравнению с контролем. Это можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию, направленную на снижение уровня окислительного стресса, неизбежно возникающего при воздействии токсических веществ.

Следует отметить, что аналогичная реакция изменения содержания зеленых пигментов и каротиноидов под воздействием токсичных веществ, в том числе фенольной природы, была обнаружена и в других исследованиях (Чукина, 2010; Винокурова, 2015).

Отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* (*a/b*) *E. densa*, инкубированной с резорцином и гидрохиноном, изменялось незначительно. Достоверное отличие по этому показателю обнаружено только в варианте с резорцином, где отношение хлорофиллов *a/b* снизилось на 16%. Это свидетельствует о перераспределении зеленых пигментов в листьях испытуемых растений. Доля хлорофилла в ССК фотосистем снижалась на 9% только в варианте с гидрохиноном.

**Содержание фотосинтетических пигментов и их соотношение в листьях *Egeria densa* Planch через 48 часов инкубирования с различными фенольными соединениями**

Параметр	Контроль	Гидрохинон, I мг/л	Резорцин, I мг/л	Пирокатехин, I мг/л	Монофенол, I мг/л
Хлорофилл <i>a</i> , мг/г сухой массы	5.02±0.23	6.03±0.04*	6.21±1.1*	5.5±0.50	5.40±0.80
Хлорофилл <i>b</i> , мг/г сухой массы	2.50±0.20	2.90±0.01*	3.60±0.30*	2.90±0.30	2.90±0.50
Каротиноиды, мг/г сухой массы	1.20±0.07	2.10±0.01*	2.10±0.13*	1.40±0.14	1.40±0.22
<i>a+b</i> , мг/г сухой массы	7.50±0.38	8.89±0.03*	9.82±0.69*	8.34±0.82	8.25±1.29
Отношение <i>a/b</i>	2.04±0.10	2.11±0.02	1.71±0.01*	1.93±0.05	1.87±0.07
Отношение <i>a+b</i> /каротиноиды	6.15±0.01	4.31±0.04*	4.63±0.04*	6.11±0.02	6.09±0.03
Доля хлорофилла в ССК, %	77.69±2.58	70.65±0.46*	80.79±0.43	75.03±1.33	76.69±1.94

\* Различия между значениями показателей на фоновом и импактном участках достоверны при  $p < 0,05$

Сравнение исследований, проведенных на растениях из природной среды обитания с модельными экспериментами, показало, что, как правило, воздействие ФС на водные макрофиты приводит к повышению содержания хлорофилла *b*. Одинаковой тенденции к изменению других характеристик фотосинтетического аппарата у растений из природной и модельной систем не обнаружено. Это связано с тем, что при изучении растений из природных гидроценозов нельзя исключить огромное количество воздействующих на них факторов: многокомпонентный состав среды обитания, биотрансформацию токсичных соединений, их фото- и автоокисление, возможность проявления эффектов синергизма и антагонизма и многое другое. Подобные исследования, очевидно, способны выявить более или менее адаптированные виды организмов в техногенно-нарушенной среде с приоритетным загрязнением по определенной группе веществ, а также показать возможные пути адаптации организмов к сложившимся условиям.

### **3.2.6. Ответные реакции водных макрофитов на раздельное и совместное действие фенольных соединений**

В водоемах, как правило, встречаются не отдельные загрязнители, а их различные комбинации, причем наряду с исходными компонентами присутствуют и продукты их трансформации (Кислицина, Борисова, 2012). Во многих случаях токсический эффект ядов, особенно близких по химической природе, взаимно усиливается при совместном действии (Стом, 1985). Известно, что ФС в своих комбинациях могут быть как синергистами, так и антагонистами (Кислицина, Борисова, 2012). Это затрудняет прогнозирование ответных реакций водных макрофитов на действие фенольных токсикантов в природных водоемах. В связи с этим были проведены исследования, направленные на выявление эффектов раздельного и совместного влияния ФС на активность ферментов водных макрофитов, имеющих тесную связь с метаболизацией фенолов. Кроме того, было исследовано содержание общего белка, флавоноидов и интенсивность ПОЛ. В качестве тест-объекта использовали *P. crispus* – широко распространенный

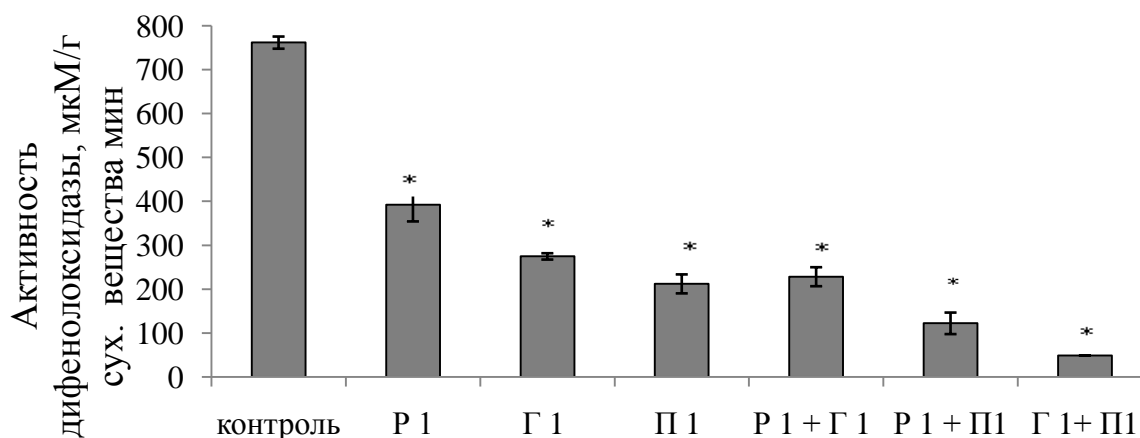


космополит, расселившийся на многих континентах (Губанов и др., 2002). Растения в течение двух суток инкубировали в дистиллированной воде с добавлением различных ФС по схеме:

- 1 – вода + гидрохинон 1 мг/л,
- 2 – вода + пирокатехин 1 мг/л,
- 3 – вода + резорцин 1 мг/л,
- 4 – вода + резорцин 1 мг/л + гидрохинон 1 мг/л,
- 5 – вода + резорцин 1 мг/л + пирокатехин 1 мг/л,
- 6 – вода + гидрохинон 1 мг/л + пирокатехин 1 мг/л,
- 7 – вода без ФС (контроль).

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

Анализ активности ДФО и пероксидазы в листьях *P. crispus* показал, что в большинстве случаев все исследованные ФС и их комбинации снижали активность ферментов: активность ДФО во всех вариантах опыта (рис. 39) была ниже контроля, активность пероксидазы также была ниже, за исключением варианта с пирокатехином, где достоверных отличий от контроля не обнаружено (рис. 40).

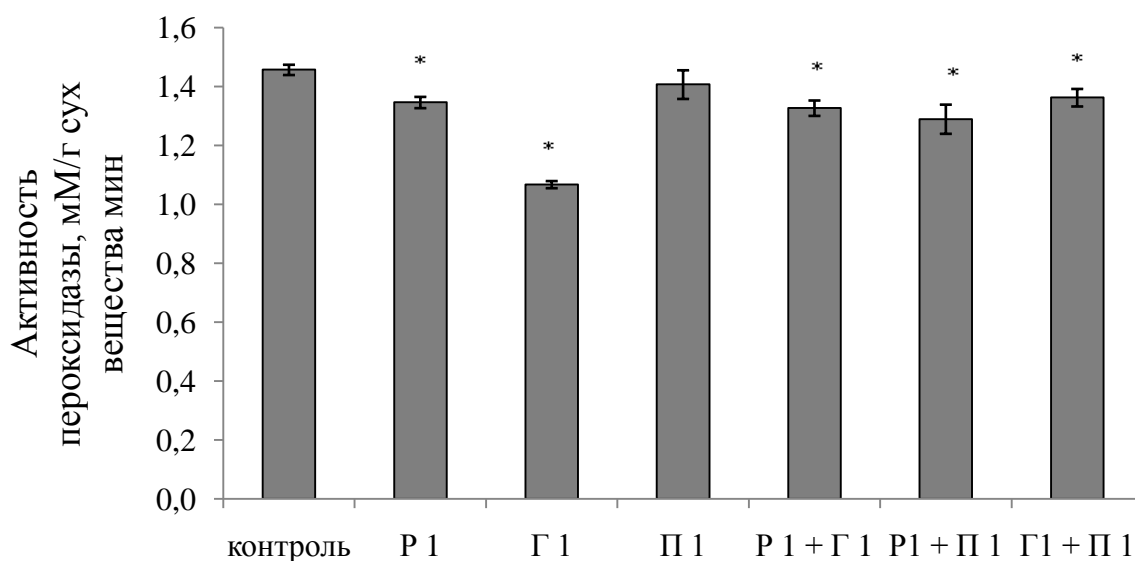


**Рис. 39.** Активность дифенолоксидазы в листьях *P. crispus* при отдельном и совместном действии резорцина (Р 1), гидрохинона (Г 1) и пирокатехина (П 1) в концентрации 1 мг/л

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

Следует отметить, что активность ДФО в листьях *P. crispus*, инкубированного с различными комбинациями ФС была в 1,2– 5,6 раз ниже по сравнению с активностью фермента в листьях растений, инкубированных с отдельными ФС. В частности, активность ДФО была ниже в вариантах с комбинацией резорцин-гидрохинон (по сравнению с резорцином), а также гидрохинон-пирокатехин (по сравнению с одним гидрохиноном или одним пирокатехином). Вероятно, это связано с тем, что при повышении суммарных концентраций ФС происходило ингибирование фермента.

Что касается активности пероксидазы, то здесь отмечен противоположный эффект совместного влияния фенолов: активность фермента в листьях *P. crispus* при инкубировании в среде, содержащей пары дифенолов: гидрохинон и резорцин или гидрохинон и пирокатехин, оказалась выше, чем в листьях, инкубированных в присутствии одного гидрохинона (рис. 40).



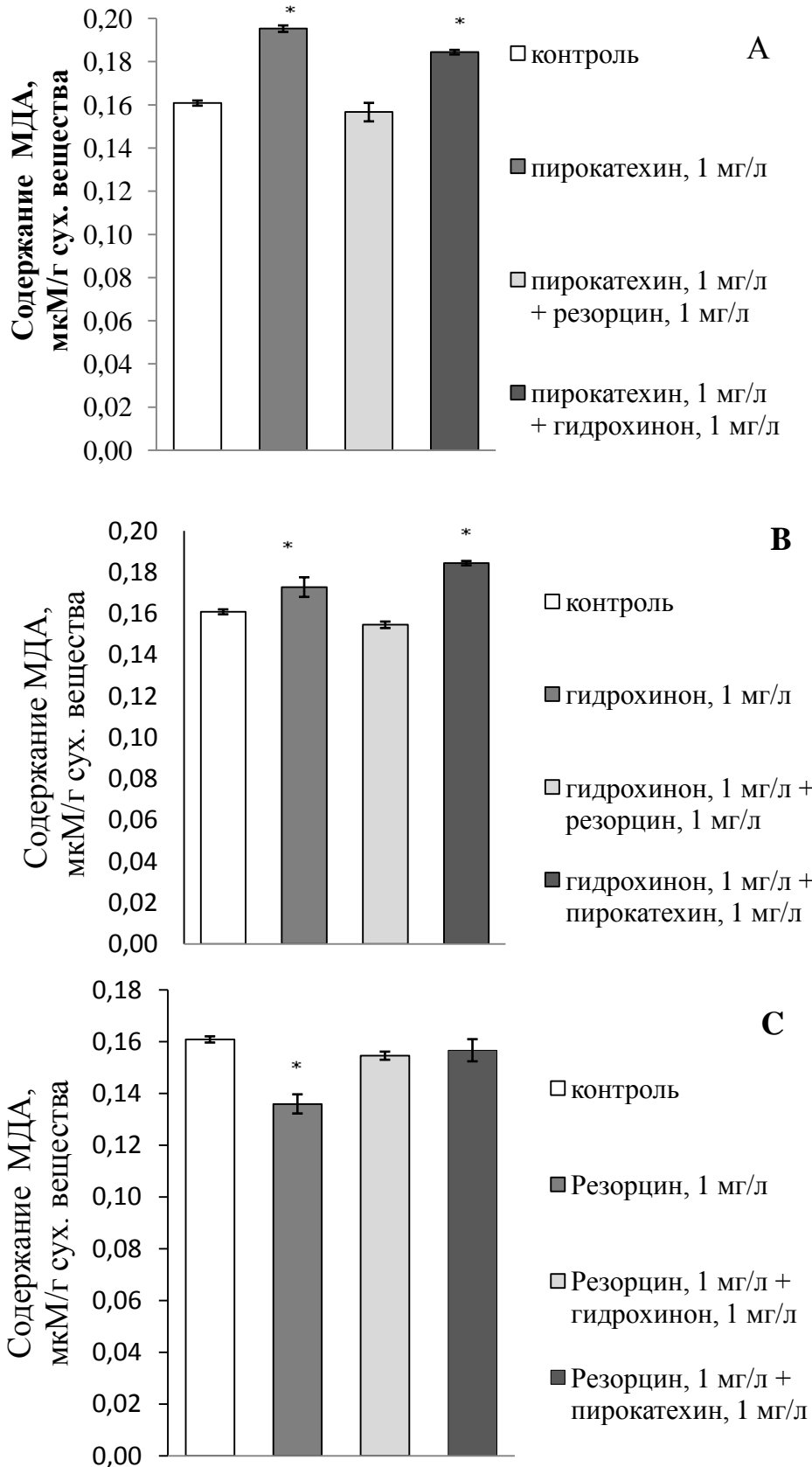
**Рис. 40.** Активность гваяколовой пероксидазы в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии резорцина (P 1), гидрохинона (Г 1) и пирокатехина (П 1) в концентрации 1 мг/л

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

Вероятно, это обусловлено снижением токсичности *n*- и *o*-дифенолов в комбинациях с другими фенолами. Известно, что токсичность *n*- и *o*-

дифенолов обусловлена хиноидными продуктами их окисления (Stom, 1974). Ослабление токсического эффекта гидрохинона в присутствии других фенолов может идти двумя путями. Один из них – конкуренция ФС за кислород, а второй – нейтрализация *n*-бензохинона, образующегося при окислении гидрохинона молекулами другого фенола (Стом, 1985).

Для проверки нашего предположения относительно ослабления токсического эффектов *n*- и *o*-дифенолов в присутствии других фенолов нами было изучено влияние ФС и их комбинаций на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях *P. crispus*. Интенсивность процесса ПОЛ, как известно, является индикаторной реакцией на наличие повреждений, связанных с окислительным стрессом. Результаты наших исследований представлены на рис. 41. Было обнаружено ослабление токсического действия как гидрохинона (рис.41В), так и пирокатехина (рис. 41А) в присутствии резорцина. По-видимому, обнаруженный ранее эффект снижения токсичности *n*-дифенола в присутствии других фенолов (Стом, 1985) справедлив и по отношению к *o*-дифенолам. Вероятно снижение токсичности *n*- и *o*-дифенолов в присутствии других фенолов обусловлено способностью образовывать в процессе окисления хиноны с последующим вовлечением их в совместные реакции с другими фенолами. Следует отметить, что резорцин не способен образовывать *m*-хинонов, а его окисление приводит к образованию сложной смеси продуктов (Робертс, Касерио,1978). Это указывает на то, что взаимодействие резорцина с другими фенолами должно происходить по другим механизмам. Присутствие в ароматическом ядре резорцина двух гидроксильных групп в *мета*-положении приводит к взаимному усилению их активирующего действия, что делает кольцо чрезвычайно активным в реакциях электрофильного замещения. По этой причине резорцин исключительно реакционноспособен по отношению к электрофильным агентам (Робертс, Касерио, 1978).



**Рис. 41.** Содержание малонового диальднгида в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии дифенолов (А, В, С)

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

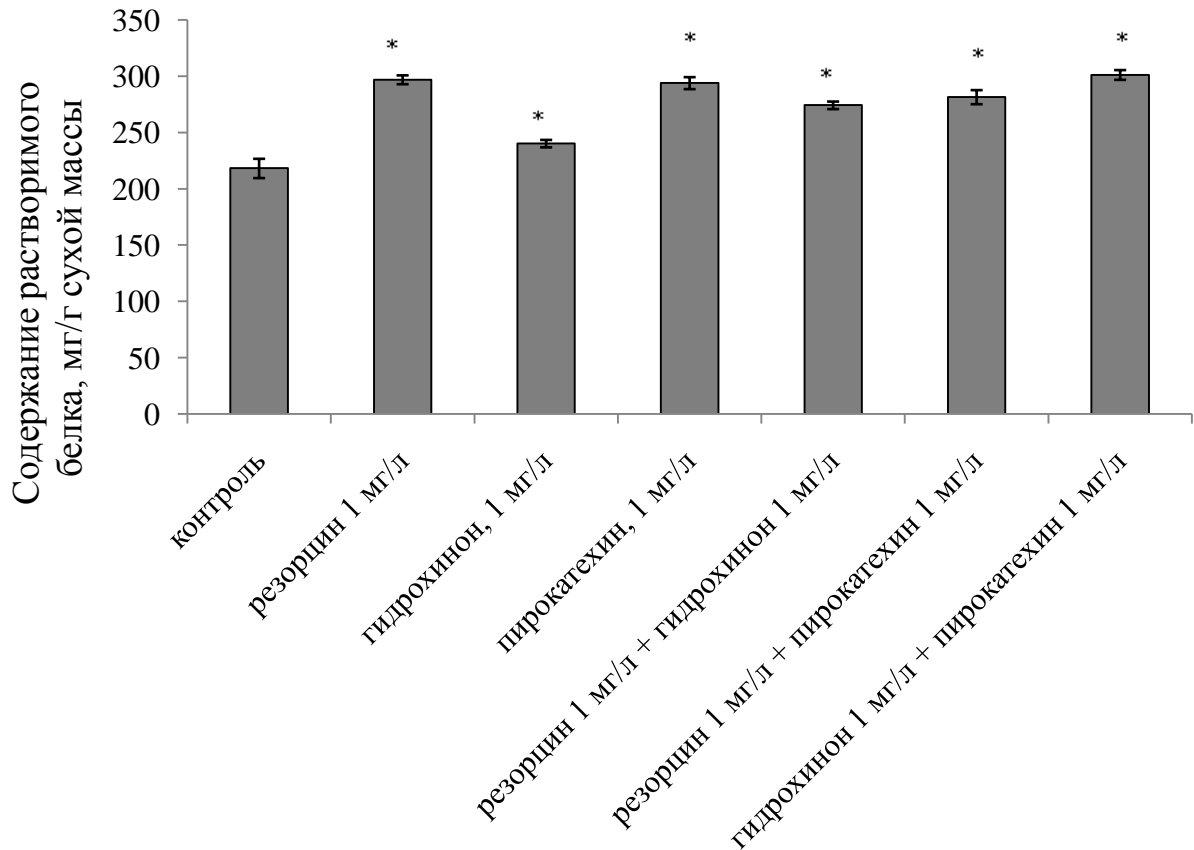
В литературе имеются сведения, что пирокатехин, гидрохинон и резорцин при определенных концентрациях способны проявлять антиоксидантную активность (Мезен и др., 2007).

Антиоксидантные свойства дифенолов связаны с наличием в их структуре подвижных атомов водорода в гидроксильных группах, которые легко отдают этот атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. В этом случае фенолы выступают в роли восстановителей свободных радикалов, превращаясь в малоактивные феноксильные радикалы (Мезен и др., 2007). В наших исследованиях зафиксировано снижение продуктов ПОЛ в варианте с резорцином по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о том, что резорцин при концентрации 1 мг/л проявляет антиоксидантную активность. Антиоксидантные свойства резорцина, вероятно, могут быть связаны с наличием подвижных атомов водорода, которые связываются со свободными радикалами и/или с реакциями электрофильного замещения с образованием новых продуктов, имеющих антиоксидантную активность. В вариантах, где резорцин был в комбинации с пирокатехином и гидрохиноном, происходило сглаживание токсического эффекта данных фенолов. Об этом говорит тот факт, что во всех комбинациях ФС с резорцином содержание продуктов ПОЛ не превышало контрольных значений, тогда как действие пирокатехина и гидрохинона по отдельности приводило к повышению содержания продуктов ПОЛ.

В настоящее время известно много способов адаптации растений к действию стрессовых факторов. Для сохранения оптимального энергетического и субстратного пула в условиях стресса растения, как правило, претерпевают значительные изменения в метаболизме, которые могут сопровождаться усилением одних метаболических путей и замедлением других. Известно, что биосинтез белка в клетках водных макрофитов способен существенно изменяться под действием внешних

условий (Розенцвет и др., 2003; Макурина, Удиванкин, 2006; Орлова и др., 2007).

Наши исследования показали, что содержание растворимого белка в листьях *P. crispus* возрастало по сравнению с контролем как в одиночных вариантах, так и при комбинациях ФС (рис. 42).



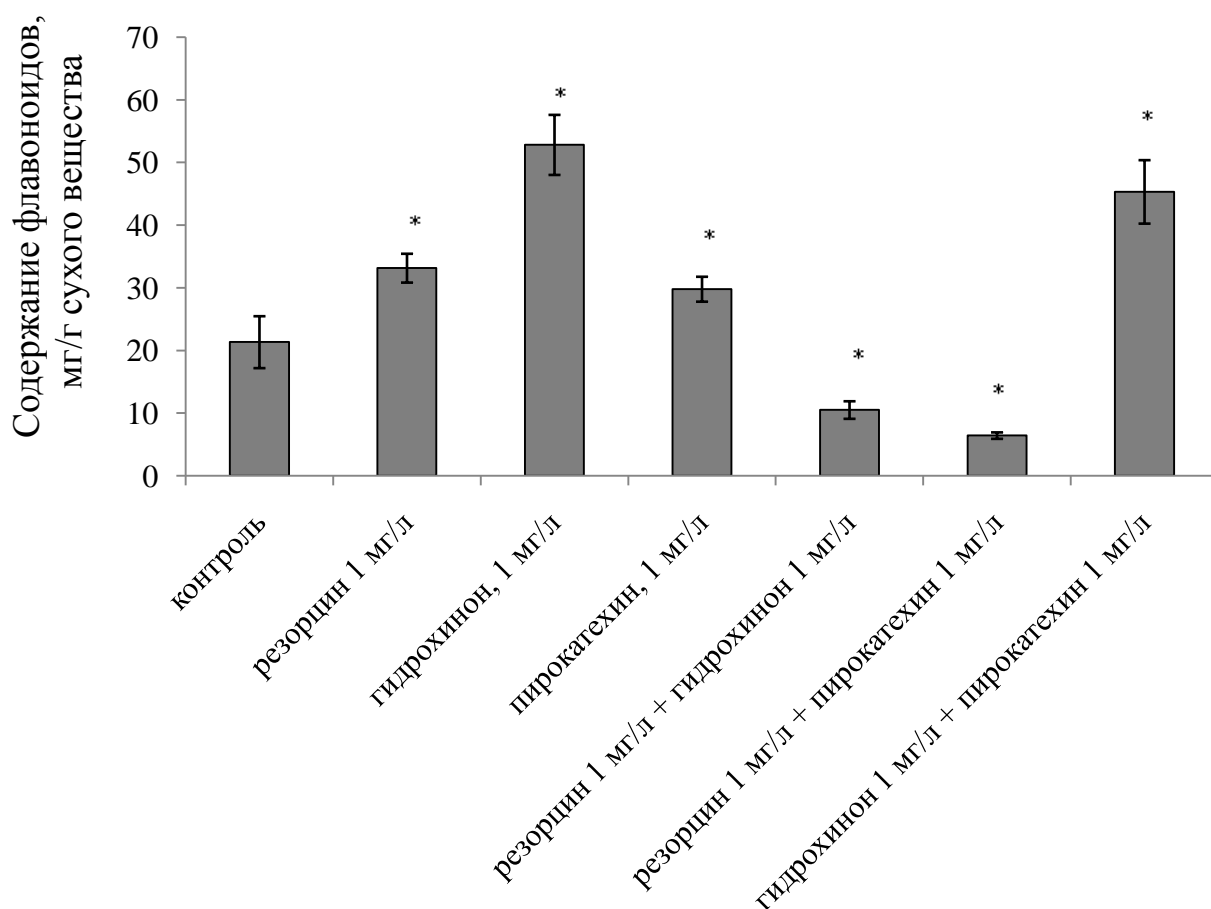
\* достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$

**Рис. 42. Содержание растворимого белка в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии дифенолов**

Возрастание содержание растворимого белка в листьях *P. crispus*, очевидно, свидетельствует о проявлении защитной функции белков, а также перестройке метаболизма на существование в условиях стресса. За последние десятилетия были достигнуты впечатляющие успехи в изучении защитных белков при неблагоприятных условиях (Боровский, 2003), однако защитные белки водных макрофитов остаются изученными недостаточно. Вероятно, увеличение содержания растворимого белка в листьях *P. crispus* происходило вследствие биосинтеза различных групп белков: белков

ферментативного аппарата, снижающих окислительный стресс, белков, защищающих растения от повреждений и устраняющих их, а также других белков, направленных на поддержание жизнедеятельности в условиях стресса.

Результаты изучения содержания флавоноидов показали прямую корреляционную связь с уровнем интенсивности ПОЛ. Было обнаружено снижение содержания флавоноидов в 3–5 раз в тех случаях, когда резорцин находился в комбинации с гидрохиноном или пирокатехином (рис. 43).



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

**Рис. 43. Содержание флавоноидов в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии дифенолов**

Если гидрохинон и пирокатехин присутствовали в среде по отдельности, то происходило возрастание содержания флавоноидов и ПОЛ, как было отмечено выше. Следует отметить, что комбинация гидрохинон –

пирокатехин не приводила к снижению содержания флавоноидов, напротив, происходило возрастание как содержания флавоноидов, так и ПОЛ. Эти данные наводят на мысль, что именно резорцин снижает токсичность пирокатехина и гидрохинона, поскольку при его отсутствии в среде происходило повышение содержания продуктов ПОЛ и флавоноидов. Из литературы известно, что биосинтез флавоноидов в растительных тканях при неблагоприятных факторах возрастает, поскольку они выполняют защитную функцию. Значительное повышение концентрации флавоноидов может свидетельствовать о наличии негативного воздействия на организм растения (Храмова и др, 2006). Ввиду этого, снижение содержания флавоноидов в листьях *P. crispus*, подтверждает гипотезу о том, что *m*- и *o*-дифенолы способны ослаблять токсический эффект других фенолов.

### **3.2.7. Ответные реакции водных макрофитов на отдельное и совместное действие фенольных соединений и тяжелых металлов**

Многие токсические вещества, включая ФС и ТМ, при совместном воздействии на живые организмы могут усиливать негативный эффект друг друга или ослаблять его. Данный аспект был исследован на примере пирокатехина и ионов меди, совместное действие которых на физиолого-биохимические показатели растений изучено крайне слабо. Известно, что водные макрофиты, обладающие высокой активностью ДФО, более подвержены токсическому действию пирокатехина по сравнению с растениями, имеющими низкую дифенолазную активность (Кирсо и др., 1988). Г.Я. Жизневской было показано, что в определенных концентрациях  $\text{Cu}^{2+}$  способна усиливать активность ДФО и снижать активность ПО (Анспок, 1978). В связи с этим мы предположили, что при комплексном загрязнении природной среды комбинация пирокатехина с  $\text{Cu}^{2+}$  окажется более опасной для растений, обладающих высокой активностью ДФО.

Для проверки этого предположения были проведены исследования, нацеленные на выявление эффектов влияния пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$  на активность ферментов, принимающих участие в метаболизации ФС –

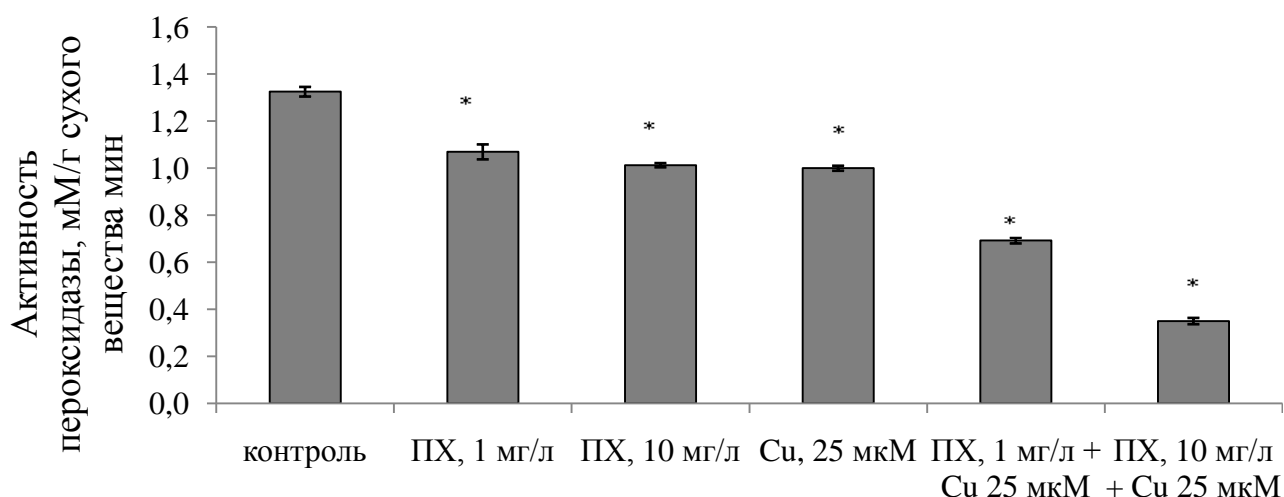


гваяколовую пероксидазу и дифенолоксидазу. Кроме того, было исследовано содержание растворимого белка в листьях водных растений. В качестве тест-объекта использовали *P. crispus* – водный макрофит, обладающий более высокой активностью ДФО по сравнению с другими исследованными растениями. *P. crispus* в течение 48 часов инкубировали в дистиллированной воде с добавлением пирокатехина и сульфата меди по схеме:

- 1 – вода (контроль),
- 2 – вода + пирокатехин 1 мг/л,
- 3 – вода + пирокатехин 10 мг/л,
- 4 – вода + сульфат меди 25 мкМ
- 5 – вода + пирокатехин 1 мг/л + сульфат меди 25 мкМ (1,6 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ ),
- 6 – вода + пирокатехин 10 мг/л + сульфат меди 25 мкМ (1,6 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ ).

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

Исследования показали, что активность ГП в листьях растений снижалась по сравнению с контролем как при добавлении пирокатехина, так и в комбинации его с  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 44). Инкубирование *P. crispus* в среде с пирокатехином в концентрациях 1 и 10 мг/л снижало активность ГП на 19% и 24%, а в комбинации с ионами меди – на 48% и 74% соответственно (рис. 44). Вероятно, действие пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$  вызывало развитие окислительного стресса в растениях *P. crispus*. В результате этого избыточное количество образовавшейся  $\text{H}_2\text{O}_2$  могло ингибировать активность ГП (Аронбаев, 2015).



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

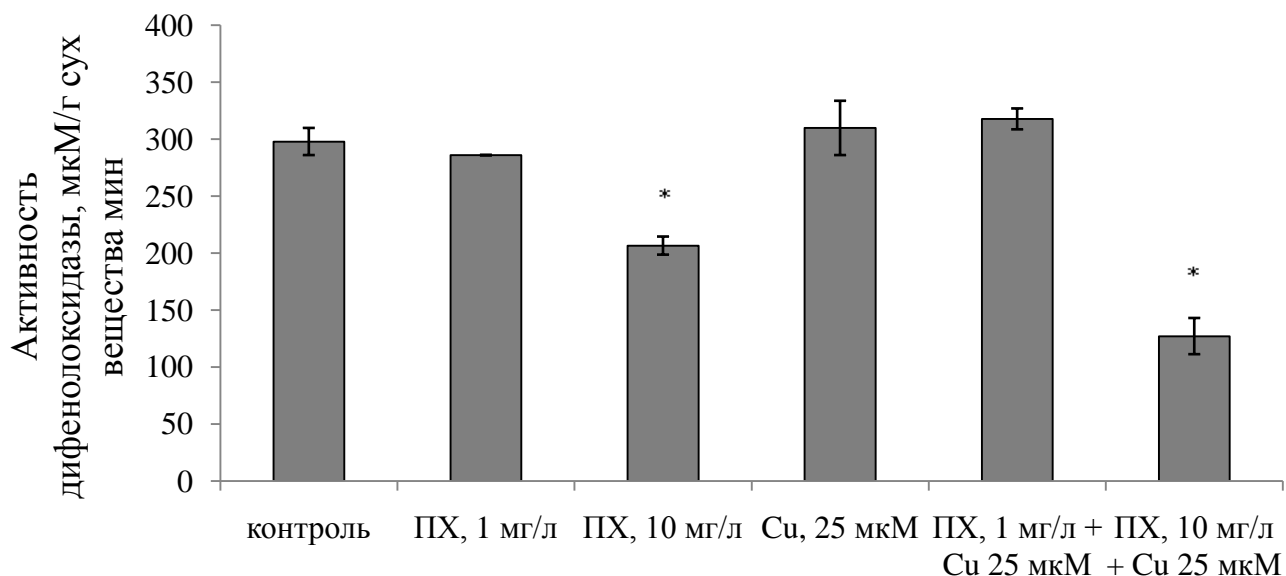
**Рис. 44. Активность гваяколовой пероксидазы в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии пирокатехина (ПХ) и меди**

Следует отметить, что совместное действие пирокатехина и меди сильнее снижало активность ГП по сравнению с действием данных токсикантов по отдельности. Это свидетельствует о развитии эффекта синергизма, когда совместное воздействие поллютантов усиливает негативный эффект, оказываемый ими по отдельности.

Активность ДФО в листьях *P. crispus* при концентрации пирокатехина 1 мг/л не изменялась по сравнению с контролем как при действии одного пирокатехина, так и при его совместном действии  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 45).

Это свидетельствует о большей устойчивости ДФО по сравнению с ГП к действию пирокатехина и ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . При более высокой концентрации пирокатехина (10 мг/л) активность фермента понижалась как при отсутствии, так и в присутствии ионов меди (на 31% и 57% соответственно). Механизм инактивации ДФО в настоящее время окончательно не выяснен. Все мнения сводятся к тому, что отправной точкой в процессе инактивации ДФО являются хиноны (Wood, 1965; Ренсон, 1968; Саксонов, 1993). Одни авторы считают, что в результате действия ДФО на полифенолы образуются хиноны, которые инактивируют ДФО за счет своих дубильных свойств. Другие

авторы предполагают, что ДФО инактивируется хинонами за счет их способности взаимодействовать с SH-группами белков (Саксонов, 1993).

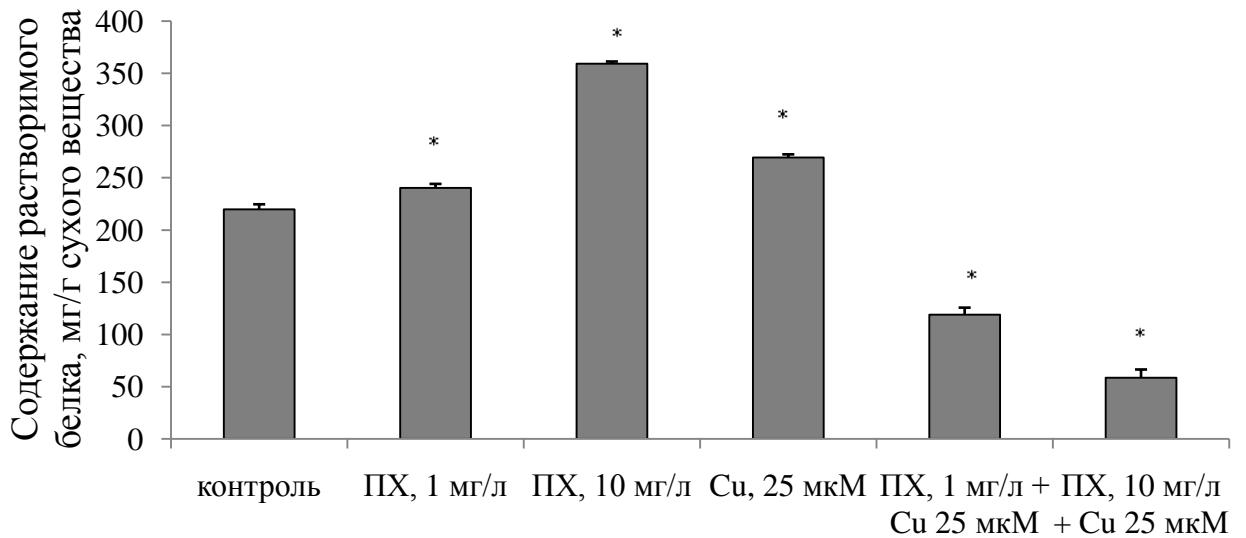


\* достоверность отличий от контроля при  $p < 0,05$

**Рис. 45. Активность дифенолоксидазы в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии пирокатехина (ПХ) и ионов меди**

Некоторые исследователи утверждают, что инактивация сопровождается взаимодействием хинонов со свободными аминогруппами фермента (Ренсон, 1968). Наши эксперименты показали, что процесс инактивации ДФО может усиливаться при совместном действии пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$ .

Содержание растворимого белка в листьях *P. crispus* возрастало при инкубировании растений с пирокатехином и  $\text{Cu}^{2+}$  по отдельности (рис. 46). Вероятно, это связано с индукцией белкового механизма защиты. При совместном действии пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$  происходило снижение растворимого белка более чем в 2 раза. Это может свидетельствовать о повышении токсичности данных загрязнителей при их совместном действии. Вероятно, происходило угнетение общего метаболизма растений, в том числе белкового синтеза *de novo*.



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

**Рис. 46. Содержание растворимого белка в листьях *P. crispus* при раздельном и совместном действии пирокатехина (ПХ) и ионов меди**

Таким образом, активность ГП и ДФО в листьях *P. crispus* при инкубировании в среде с повышенной концентрацией пирокатехина (10 мг/л) снижалась как при его раздельном действии, так и в комбинации с ионами меди. При совместном действии пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$  при меньшей его концентрации (1 мг/л) активность ДФО почти не изменялась на фоне существенного снижения активности ГП. Все это свидетельствует о том, что характер взаимоотношений пирокатехина и  $\text{Cu}^{2+}$  и эффекты их влияния на активность ферментов у растений могут различаться в зависимости от концентраций токсикантов и вида фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования структурно-функциональных показателей водных макрофитов из загрязненной фенолами среды обитания показали, что адаптированные и неадаптированные растения характеризовались неодинаковой реакцией на стресс, которая зависела от вида растения и проявлялась в различной степени активации ферментативных и неферментативных механизмов защиты.

В формировании устойчивости участвуют механизмы, связанные с трансформацией ФС и устранением эффектов окислительного стресса. В трансформации экзогенных фенолов задействован ферментативный аппарат водных макрофитов – главным образом дифенолоксидаза и гваяколовая пероксидаза. В устранении эффектов окислительного стресса – низкомолекулярные АО.

Согласно литературным данным и результатам проведенных экспериментов, данные механизмы характерны для наземных и водных макрофитов и являются частью гомеостатических процессов.

Дальнейшие исследования действия фенольного загрязнения на макрофиты должны быть направлены на изучение молекулярно-генетических и метаболических аспектов адаптации растений, что позволит выявить видоспецифичные реакции, способствующие толерантности к ФС. Это особенно важно для разработки научно обоснованных методов оптимизации фиторемедиационных технологий.

## 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, толщины 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  $\text{Ni}^{2+}$  (0,05 мг/л) проявляли антагонистический эффект. Пирокатехин (1–10 мг/л) и  $\text{Cu}^{2+}$  (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.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Абрамова, Э.А. Содержание фотосинтетических пигментов и аскорбиновой кислоты в проростках вики в присутствии хлорида никеля / Э.А. Абрамова, В.В. Иванищев // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2012. – № 9 (128), вып. 19. – С. 152–155.
2. Анспок, П.И. Микроудобрения / П.И. Анспок. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 272 с.
3. Аронбаев, Д. М. Кинетика пероксидазного окисления гидрохинона перекисью водорода / Д. М. Аронбаев // Молодой ученый. – 2015. – № 15. – С. 36–45.
4. Артюшенко, Т.А. Участие аскорбиновой кислоты и ферментов ее метаболизма в физиологической адаптации гороха и кукурузы к совместному действию соединений никеля и кадмия / Т.А. Артюшенко, В.Н. Гришко // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс». – М., 2010. – С. 39–40.
5. Архипова, Н.П. Окрестности Свердловска / Н.П. Архипова. – Свердловск: Сред.-Урал. кн. изд-во, 1981. – 201 с.
6. Беккер, Х. Органикум. Т.2. – Пер. с нем. / Х. Беккер [и др.] – М.: Мир, 1992. – 474 с.
7. Бухов, Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза / Н.Г. Бухов // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – С. 825–837.
8. Боровский, Г.Б. Стрессовые белки растений при неблагоприятных температурных условиях: дис...докт. биол. наук: 03.00.12 / Боровский Геннадий Борисович. – Иркутск, 2003. – 343 с.
9. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов / Г. Бриттон. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
10. Бялт, В.В. *Egeria densa* Planch. (Hydrocharitaceae) – новый адвентивный вид для флоры Украины / В.В. Бялт, Л.В. Орлова // Новости сист. высш. раст. – 2003. – Т.35. – С. 211–214.

11. Быкова, Г.С. Водный макрофит наяда мелкозубчатая в доочистке сточных вод / Г.С. Быкова, И.Ф. Шаталаев, А.В. Воронин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.13, № 1(8). – С. 2048–2052.
12. Винокурова, Н.В. Макрофиты пресных вод как объект биомониторинга полихлорированных бифенилов (на примере реки Урал в районе Оренбурга): автореф. канд. дисс: 03.02.08 / Винокурова Наталья Викторовна. – Оренбург, 2015. – 25 с.
13. Вигдорович, В.И. Адсорбционная способность глауконита Бондарского района Тамбовской области / В.И. Вигдорович, Л.Е. Цыганкова, Д.В. Николенко [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, вып. 1. – С. 121–126.
14. Вигдорович, В.И. Влияние рН на извлечение фенола в проточном растворе глауконитом ГБРТО и его фракциями / В.И. Вигдорович, Л.Е. Цыганкова, А.И. Акулов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11, вып. 2. – С. 256–263.
15. Винокурова, Р.И. Исследование влияния препарата «Диофур» на содержание каротиноидов в листьях салата (*Lactuca sativa* L.) / Р.И. Винокурова, О.В. Силкина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2010. – Т. 4, вып. 28 (1). – С. 255–257.
16. Волынец, А.П. Интенсивность роста растяжением как результат взаимодействия ауксина и фенольных соединений / А.П.Волынец // Ботаника: исследования / Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича. – Минск: Право и экономика. – 2005. – Вып. 33. – С. 268–276.
17. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу: Учеб. пособие для студентов вузов / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Изд. Центр «Академия», 2003. – 241 с.
18. Гаевский, Н.А. Избранные главы экологической физиологии растений. Конспект лекций / Н.А. Гаевский, Т.И. Голованова, В.М. Гольд. – Красноярск, 2012. – 91 с.



19. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Свердловской области в 2013 году». – Екатеринбург: Изд-во УМЦ УПИ, 2014. – 344 с.
20. Гринин, А.Л. Сравнительный анализ физиологических механизмов солеустойчивости различных сортов горчицы / А.Л. Гринин, И.А. Коршунов, В.П. Холодова, Вл.В. Кузнецов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия агрономия и животноводство. – 2010. № 1. – С. 27–38.
21. Грушко, Я.М. Сточные воды сульфатцеллюлозных предприятий и охрана водоемов от загрязнителей / Я.М. Грушко, О.М. Кожова. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 172 с.
22. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т.1. Папоротники, хвощи, плауны, голосеменные, покрытосеменные (однодольные) / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – М.: Товарищество научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2002. – 526 с.
23. Гунес, А. Цинк снимает вызванный бором окислительный стресс у растений фасоли / А. Гунес, А. Инал, И.Г. Багси // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 555–562.
24. Гуртяк, А.А. Оценка состояния среды городской территории с использованием березы повислой в качестве биоиндикатора / А.А. Гуртяк, В.В. Углев // Известия Томского политехнического ун-та. – 2010. – Т. 317, №1.– С. 200–204.
25. Даниленко, С.А. Состав фотосинтетических пигментов у *Zostera marina* и *Zostera japonica* в эстуарии реки Ольга (Центральное приморье) / С.А. Даниленко, А.В. Ольховик // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. – 2014. – Вып. 6. – С. 201–205.
26. Деви, С.Р. Антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди / С.Р. Деви, М.Н.В. Прасад // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 233– 237.

27. Доклад об экологической ситуации в Свердловской области в 2010 году. – Екатеринбург, 2011. – 122 с.
28. Доклад об экологической ситуации в Свердловской области в 2011 году. – Екатеринбург: Правительство Свердлов. обл., 2012. – 116 с.
29. Дурмишидзе, С.В. Промежуточные продукты ферментативного окисления бензола и фенола / С.В. Дурмишидзе, Д.Ш. Угрехелидзе, А.Н. Джикия, Д.Ш. Цевелидзе // Докл. АН СССР. – 1969. – Т. 184. – С. 466–469.
30. Дурмишидзе, С.В. Усвоение бензола плодами из атмосферы / С.В. Дурмишидзе, Д.Ш. Угрехелидзе, А.Н. Джикия // Прикладная биохимия и микробиология. – 1974. – Т.10. – С. 673–676.
31. Ершов, В.В. Пространственно-затрудненные фенолы / В.В. Ершов, Г.А. Никифоров, А.А. Володькин. – М.: Химия, 1972. – 172 с.
32. Жмылев, П.Ю. Основные термины и понятия современной биоморфологии растений / П.Ю. Жмылев, Ю.Е. Алексеев, Е.А. Карпухина. – М.: Изд-во МГУ, 1993. – 149 с.
33. Запрометов, М.Н. О способности к расщеплению бензольного кольца у высших растений / М.Н. Запрометов // Докл. АН СССР. – 1959. – Т.125. – С. 1359.
34. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
35. Захаров, В.М. Здоровье среды: методика оценки / В.М.Захаров, А.С. Баранов, В.И. Борисов [и др.] – М.: Центр экологической политики России, 2000. – 68 с.
36. Захаров, В.М. Методология оценки здоровья среды. Последствия Чернобыльской катастрофы: здоровье среды / В.М. Захаров, Е.Ю. Крысанов, А.В. Пронин. – М., 1996. – 170 с.
37. Изотов, А.А. Использование высших водных растений как индикаторов состояния окружающей среды: автореф. канд. дисс: 03.00.16 / Андрей Александрович Изотов. – Калуга, 2003. – 31 с.

38. Калинкина, Л.Г. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот / Л.Г. Калинкина, Л.В. Назаренко, Е.Е. Гордеева // Физиология растений. – 1990. – Т.3, вып. 3. – С. 617–621.
39. Капитонова, О.А. Особенности анатомического строения вегетативных органов некоторых видов макрофитов в условиях промышленного загрязнения среды / О.А. Капитонова // Экология. – 2002. – № 1. – С. 64–66.
40. Квеситадзе, Г.И. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Г.И.Квеситадзе, Г.А. Хатисашвили, Т.А. Садунишвили, З.Г. Евстигнеева. – М.: Наука, 2005. – 198 с.
41. Кения, М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 456– 470.
42. Кефели, В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны / В.И. Кефели. – М.: Наука, 1974. – 253 с.
43. Кирсо, У.Э. Превращение канцерогенных и токсических веществ в гидросфере / У.Э. Кирсо, Д.И. Стом, Л.И. Белых, Н.И. Ирха. – Таллин: Валгус, 1988. – 271 с.
44. Кислицина, М. Устойчивость водных растений к фенольным соединениям. Анатомо-морфологические и физиолого-биохимические аспекты / М. Кислицина, Г. Борисова. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 70 с.
45. Кислицина, М.Н. Исследование влияния фенольных соединений на анатомо-морфологические показатели *Elodea densa* Planch. / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде: материалы Всероссийской научной конференции. – Иркутск, 2013. – С. 335–336.
46. Кислицина, М.Н. Роль макрофитов в процессе самоочищения реки Ляля в условиях загрязнения сточными водами целлюлозно-бумажного комбината / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Актуальные проблемы

экологии: материалы X международной научно-практической конференции. В 2 ч. Ч.2. ГрГУ им. Я. Купалы. – Гродно, 2014. – С. 94–96.

47. 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.

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

49. Кислицина, М.Н. Влияние экзогенных дифенолов на морфологические характеристики водных макрофитов / М.Н. Кислицина, Г.Г. Борисова // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: тезисы докладов Всероссийской научной конференции. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. – С. 254.

50. 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.

51. Козюкина, Т.Ж. Некоторые аспекты положительного действия гумата натрия на устойчивость растений к промышленному загрязнению атмосферы / Т.Ж. Козюкина // Гуминовые удобрения: теория и практика их применения. – Днепропетровск, 1983. – Т.9. – С. 31–33.

52. Константинов, Е.Л. Особенности флуктуирующей асимметрии листовой пластинки березы повислой (*Betula pendula* Roth.) как вида биоиндикатора: автореф. канд. дисс: 03.00.16 / Евгений Львович Константинов. – Калуга, 2001. – 21 с.

53. Коровкин, О.А. Анатомия и морфология высших растений: словарь терминов / О.А. Коровкин.– М.: Дрофа, 2007. – 268 с.
54. Корте, Ф. Экологическая химия / Ф. Корте, М. Бахадир, В. Клайн [и др.]. – М.: Мир, 1996. – 395 с.
55. Красная книга Вологодской области. Т. 2. Растения и грибы / Отв. ред. Г. Ю.Конечная, Т. А. Сулова. – Вологда: ВГПУ, Изд-во «Русь», 2004. – 360 с.
56. Красная книга Иркутской области / Правительство Иркутской области. Министерство природных ресурсов и экологии Иркутской области. Отв. ред. В. В. Попов. – Иркутск: ООО Изд-во «Время странствий», 2010. – 480 с.
57. Кретович, В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович. – М.: Высш. шк., 1980. – 445 с.
58. Кригер, Н.В. Влияние техногенной нагрузки на содержание аскорбиновой кислоты в листьях древесных растений, произрастающих в разных районах города Красноярска / Н.В. Кригер, М.А. Козлов, Е.С. Баранов // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – № 10. – С. 116–119.
59. Кузнецов, В.В. Физиология растений / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Высшая школа, 2006. – 742 с.
60. Кузнецов, В.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / В.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321–336.
61. Кузнецов, М.Н. Сравнительная характеристика особенностей флуктуирующей асимметрии листьев яблони в разных экологических условиях / М.Н. Кузнецов, Л.В. Голышкин // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 3. – С. 72–77.
62. Куликова, Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях

абиотических стрессов: дисс. докт. биол. наук: 03.00.16 / Куликова Наталья Александровна. – Москва, 2008. – 302 с.

63. Кумани, М.В. Особенности фенольного загрязнения рек Курской и Белгородской области / М.В. Кумани, Ю.А. Соловьева, А.Г. Корнилов // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2011. – № 15 (110), вып. 16. – С. 193–198.

64. Кунаева, Р.М. Ферментативное расщепление фенольных соединений / Р.М. Кунаева, Г.Р. Балтабаева. – Алма-Ата.: Наука, 1979. – 74 с.

65. Ладыгин, В.Г. Биологические функции каротиноидов в хвое ели и пихты / В.Г. Ладыгин // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 6. – С. 904–923.

66. Лебедева, О.А. О распространении некоторых видов шелковников (*Ranunculaceae*) в водоемах и водотоках Ярославского Поволжья / О.А. Лебедева, А.Г. Лапиров // Ярославский педагогический вестник. – 2013. – № 2, Т. III. – С. 55–60.

67. Лилле, Ю.Э. Добыча и переработка горючих сланцев / Ю.Э. Лилле, Х.А. Кундель. – Л.: Недра, 1967. – Вып. 16. – 250 с.

68. Лисицына, Л.И. Флора водоемов Волжского бассейна / Л.И. Лисицына, Л.И. Папченков, В.И. Артеменко. – М.: Товарищество научных сообществ КМК, 2009. – 219 с.

69. Лукин, С.В. Мониторинг содержания никеля в почвах / С.В. Лукин // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 3. – С. 14–16.

70. Макаренко, О.А. Взаимодействие флавоноидов с протеинами / О.А. Макаренко, А.П. Левицкий // Досягнення біології та медицини. – 2012. – № 2 (20). – С. 75–82.

71. Макурина, О.Н. Влияние ксенобиотиков на ферментативную активность в тканях водного погруженного растения *Ceratophyllum demersum* / О.Н. Макурина, С.А. Розина // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2012. – № 9 (100). – С. 200–210.

72. Макурина, О.Н. Некоторые биохимические показатели *Potamogeton perfoliatus* L. как индикаторы антропогенного загрязнения воды Саратовского водохранилища тяжелыми металлами / О.Н. Макурина, А.В. Удиванкин // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2006. – № 7 (47). – С. 134–138.

73. Мезен, Н.И. Биоантиоксидантная активность производных пирокатехина и гидрохинона / Н.И. Мезен, О.И. Шадыро, А.С. Федулов // Медицинский журнал: научно-практический рецензируемый журнал. – 2007. – № 2. – С. 65–66.

74. Меньщикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, №4. – С. 442–455.

75. Месхи, А.Б. Биохимия растений / А.Б. Месхи. – Тбилиси: Мецниереба, 1973. – С. 255–264.

76. Методы оценки антиоксидантного статуса растений: учебно-методическое пособие. – Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2012. – 72 с.

77. Моисеенко, Т.И. Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты / Т.И. Моисеенко. – М.: Наука, 2009. – 400 с.

78. Мокин, А.А. Адаптивные морфологические реакции ивы белой (*Salix alba* L.) в экстремальных условиях произрастания: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Мокин Александр Анатольевич. – Оренбург, 2015. – 16 с.

79. Мокроносков, А.Т. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов / А.Т. Мокроносков, Р.А. Борзенкова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1978. – Т. 61. – С. 119–133.

80. Мурзин, И.Р. Особенности действия загрязнителей различной химической природы на содержание водорастворимых белков в тканях водного погруженного растения *Egeria densa* / И.Р. Мурзин, А.А. Косицына,

О.Н. Макурина, О.А. Розенцвет // Вестник Сам ГУ – Естественнонаучная серия. – 2010. – № 4 (78). – С. 191–199.

81. Нагалеvский, В.Я. Экологическая анатомия растений: учебное пособие / В.Я. Нагалеvский, В.Г. Николаевский. – Краснодар: Изд-во Кубанского гос. ун-та, 1981. – 88 с.

82. Непенин, Ю.Н. Технология целлюлозы. Т. 2: Производство сульфатной целлюлозы: уч. пособие для вузов / Ю.Н. Непенин. – М.: Лесная промышленность, 1990. – 600 с.

83. Никитин, В.М. Химия древесины / В.М. Никитин, А.В. Оболенская, В.П. Щеголев. – М.: Лесная промышленность, 1978. – 368 с.

84. Новаковская, Т.В. Видовое разнообразие и пигментный комплекс макрофитов водоемов окрестностей г. Сыктывкара (Республика Коми) / Т.В. Новаковская, О.В. Дымова // Вестник Нижегородского университета им Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 5 (1). – С. 127–134.

85. Новиков, В.С. Популярный атлас-определитель. Дикорастущие растения / В.С. Новиков. И.А. Губанов. – М.: Дрофа, 2006. – 415 с.

86. Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений / сост. Р. А. Борзенкова, Е. В. Храмцова. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2006. – 26 с.

87. Определитель растений Ханты-Мансийского автономного округа / под ред. И.М. Красноборова. – Новосибирск – Екатеринбург: Изд-во «Баско», 2006. – 304 с.

88. Орлова, Н.В. Зависимость содержания водорастворимых белков в органах галофитов от уровня засоления почвы / Н.В. Орлова, М.Г. Кусакина, Н.В. Сучкова // Вестник Пермского университета. – 2007. – Вып. 5 (10). – С. 31–34.

89. Павленко, В.В. Мутагенное действие монофенолов и дифенолов на штамм 15В–П4 дрожжей сахаромицетов / В.В. Павленко, Л.Я. Трубачева //



Влияние фенольных соединений на гидробионтов. – Иркутск: Изд-во Иркутск. гос. ун-та, 1981. – С. 40–52.

90. Погребняк, А.В. Квантово-химическое моделирование процесса сорбции лекарственных веществ и иммобилизации фитокомпонентов в лекарственных формах / А.В. Погребняк, Э.Ф. Степанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 7. – С. 36–40.

91. Поклонов В.А. Влияние меди и никеля на макрофиты в условиях экспериментальных микрокосмов при низкой температуре воды / В.А. Поклонов // Вестник Северо-Восточного федерального университета им М.К. Аммосова. – 2016. – Вып. 8 (53). С. 20–27.

92. Полевой, В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.

93. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: уч. пособие / О.Г. Полесская. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.

94. Полехина, Н.Н. Динамика накопления биохимических соединений антиоксидантного действия в разных органах гречихи в процессе онтогенеза / Н.Н. Полехина, Н.Е. Павловская // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10(2). – С. 357–361.

95. Половникова, М.Г. Эколого-физиологические особенности газонных растений на разных этапах онтогенеза в условиях городской среды: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Половникова Марина Григорьевна. – Нижний Новгород, 2007. – 24 с.

96. Потокин, А.Ф. Влияние стоков промышленно-животноводческих комплексов на фотосинтетическую активность болотных растений / А.Ф. Потокин. – Л.: ЛГУ, 1984. – 124 с.

97. Починок, Х.Н. Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починок. – Киев: Наукова думка, 1976. – 234 с.

98. Радюкина, Н.Л. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата / Н.Л. Радюкина, А.В.

Шашукова, Н.И. Шевякова, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – С.721–730.

99. Распопов, И.М. Сравнительный анализ флоры России и мира / И.М. Распопов, В.Г. Папченков, В.В. Соловьева // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 17–26.

100. Робертс, Дж. Основы органической химии / Дж. Робертс, М. Касерио. – М.: Мир, 1978. – Т.2. – 858 с.

101. Ренсон, С. Кислоты растений / С. Ренсон // Биохимия растений Т. 1. – М.: Мир, 1968. – С. 298–310.

102. Рогожин, В.В. Практикум по биологической химии: уч.-метод. пособие / В.В. Рогожин. – СПб: Изд-во «Лань», 2006. – 256 с.

103. Розенцвет, О.А. Аккумуляция меди и ее влияние на метаболизм белков, липидов и фотосинтетических пигментов в листьях *Potamogeton perfoliatus* L. / О.А. Розенцвет, С.В. Мурзаева, И.А. Гущина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2003. – Т.5, № 2. – С. 305–311.

104. Рудаков, О.Б. Спутник хроматографиста / О.Б. Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров [и др.]. – Воронеж: Изд-во «Водолей», 2004. – 528 с.

105. Садчиков, А.П. Экология прибрежно-водной растительности / А.П. Садчиков, М.А. Кудряшов. – М.: НИА-Природа, РЭФИА, 2004. – 220 с.

106. Сакарийаво, О.С. Изменение содержания воды и пролина у разных по засухоустойчивости сортов пшеницы в ходе адаптации к водному дефициту и на этапе восстановления / О.С. Сакарийаво, В.П. Холодова, А.Б. Мещеряков // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2001. – С. 89–94.

107. Саксонов, М.Н. Взаимодействие фенольных соединений и гидрофитов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00. 18 / Саксонов Михаил Наумович. – Иркутск, 1993. – 20 с.

108. Синькевич, М.С. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом / М.С.

Синькевич, А.Н. Дерябин, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2009. – Т.56. – С.186–192.

109. Соколова, Г.Г. Флуктуирующая асимметрия листовой пластинки клевера ползучего при оценке стабильности развития / Г.Г. Соколова, Г.Т. Камалтдинова // Известия Алтайского государственного университета. – 2011. – № 3-1(71). – С. 40–43.

110. Стом, Д.И. Механизм снижения токсичности гидрохинона в присутствии других фенолов / Д.И. Стом // Гидробиологический журнал. – 1985. – Т. 21, № 6. – С. 88–90.

111. Стом, Д.И. Продукты окисления *o*-фенолов как ингибиторы роста растений: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.ЮИ / Стом Дэвард Иосифович. – Иркутск, 1970. – 27 с.

112. Стом, Д.И. Фитотоксичность и механизм детоксикации фенолов водными растениями: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук: 03.00.18 / Стом Дэвард Иосифович. – Киев, 1982. – 48 с.

113. Стом, Д.И. Роль харовых водорослей и других водных растений в процессах деструкции фенольных соединений / Д.И. Стом, С.С Тимофеева, Л.И. Белых, В.В. Буторов // Водные ресурсы. – 1978. – №4. – С. 105–111.

114. Стом, Д.И. К вопросу о природе ферментов, ответственных за окисление фенолов харовыми водорослями / Д.И. Стом, С.С. Тимофеева, В.В. Буторов // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, вып. 4. – С. 841–845.

115. Струнников, В.Н. О химической природе водорастворимого щелочного лигнина / В.Н. Струнников, Д.В. Тищенко // Журн. прикладной химии. – 1965. – Т. 38, № 11. – С. 2545–2549.

116. Тимофеева, С.С. Молекулярно-биохимические подходы к оценке взаимодействия ксенобиотики – гидрофиты / С.С.Тимофеева // Влияние фенольных соединений на гидробионтов. –Иркутск: Иркутский государственный университет им. А.А. Жданова, 1981. – С. 3–9.

117. Тимофеева, С.С. О воздействии некоторых фенолов и хинонов на ассимиляцию  $^{14}\text{CO}_2$  байкальской водорослью *Draparnaldiella pilosac.*

Meyeretskabitsch / С.С. Тимофеева, Э.В. Виниченко, А.Б. Ошаров // Влияние фенольных соединений на гидробионтов. – Иркутск: Иркутский государственный университет им. А.А. Жданова, 1981. – С. 24–31.

118. Титова, М.С. Содержание фотосинтетических пигментов в хвое *Piceaabies* и *Piceakoraiensis*/ М.С. Титова // Вестник ОГУ. – 2010. – № 12 (118). – С. 9–12.

119. Турский, Ю.И. Очистка производственных сточных вод / Ю.И. Турский, М.В. Филиппов. – Л.: Химия, 1967. – 332 с.

120. Трунова, Т.И. Растение и низкотемпературный стресс / Т.И. Трунова. – М.: Наука, 2007. – 54 с.

121. Угрехелидзе, Д.Ш. Поглощение салициловой кислоты и анилина корнями гороха / Д.Ш. Угрехелидзе, В.А. Пириашвили, Ш.М. Рухадзе // Физиология растений. – 1986. – Т.33, вып. 1. – С.165–170.

122. Улицкая, Ю.Ю. Влияние интегрального технохимического загрязнения на анатомическое строение мезофилла листьев *Betula pendula* Roth. и *Tilia cordata* Mill / Ю.Ю. Улицкая // Экология промышленного региона и экологическое образование: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. – Нижний Тагил, 2004. – С. 54.

123. Унифицированные методы анализа вод / под ред. Лурье Ю.Ю. – М.: Химия, 1973. – 375 с.

124. Федорова, Е.В. Анализ и проблемы нормирования техногенных воздействий на окружающую среду / Е.В. Федорова, Я.Я. Яндыганов // Известия Уральского государственного экономического университета. – 2003. – № 6. – С. 3–15.

125. Фелленберг, Г. Загрязнение природной среды / Г. Фелленберг. – М.: Мир, 1997. – 228 с.

126. Храмова, Е.П. Особенности накопления флавоноидов у растений в условиях радиоактивного загрязнения / Е.П. Храмова, О.В. Тарасов, Е.И. Крылова, С.Я. Сыева // Вопросы радиационной безопасности. – 2006. – № 4. – С. 13–20.

127. Холодова, В.П. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации / В.П. Холодова, К.С. Волков, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 848–858.

128. Чукина, Н.В. Структурно-функциональные показатели высших водных растений в связи с их устойчивостью к загрязнению среды обитания: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Чукина Надежда Владимировна. – Борок, 2010. – 24 с.

129. Чукина, Н.В. Показатели мезоструктуры фотосинтетического аппарата гидрофитов из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия / Н.В. Чукина, Г.Г. Борисова, М.Г. Малёва // Казанская наука. № 1. – Казань: Изд-во Казанский Издательский Дом, 2009. – С. 8–13.

130. Шадрина, Е.Г. Диагноз ставит природа / Е.Г. Шадрина, Я.Л. Вольперт // Экология и жизнь. – 2006. – №2. – С. 60–63.

131. Шалбуев, Д.В. Экобиотехнологический метод переработки овчинно-шубного и пушно-мехового сырья: автореф. дисс. ... д-ра тех. наук: 05.19.05 / Шалбуев Дмитрий Валерьевич. – Улан-Уде, 2010. – 35 с.

132. Шевякова, Н.И. Распределение Cd и Fe в растениях *Mesembryanthemum crystallinum* при адаптации к Cd-стрессу / Н.И. Шевякова, И.А. Нетронина, Е.Е. Аронова, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 1993. – Т.53. – С.753–768.

133. Ягольник, Е.А. Липофильность и антиоксидантные свойства комплексов флавоноидов с металлами переменной валентности / Е.А. Ягольник, Б.Б. Махмутов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – № 12 (3). – С. 103–104.

134. Якубке, Х-Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х-Д Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 438 с.

135. Янин, Е.П. Органические вещества техногенного происхождения в водах городских рек / Е.П. Янин // Экологическая экспертиза: обзорная информация. – М.: ВИНТИ, ЦЭП. – 2004. – № 4. – С. 42–64.

136. Яцко, Я.Н. Пигментный аппарат вечнозеленых растений на Севере: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.01.05 / Яцко Яков Николаевич. – СПб., 2010. – 23 с.
137. Saradhi, P.P. Proline in relation to free radical production in seedlings of *Brassica juncea* raised under sodium chloride stress / P.P. Saradhi, P. Mohanty // *Plant and Soil*. –1993. –155/156.– P. 497–500.
138. Arora, A. Oxidative stress and antioxidative system in plants /A. Arora, R.K. Sairam, G.C. Srivastava // *Current Science*.–2002. – Vol. 82. – P. 1227–1238.
139. Barber, J.T. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba* / J.T.Barber, H.A. Sharm, H.E. Ensley, M.A. Polito, D.A. Thomas // *Chemosphere*. – 1995. – Vol. 31, N.6. – P. 3567–3574.
140. Bates, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies /L. S.Bates // *Plant Soil*. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
141. Beezer, A.E. Quantitative structure–activity relationships: the Van't Hoff heats of transfer of resorcinol monoethers from water to *n*-octanol / A.E. Beezer, W.H. Hunter, D.E. Storey // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1980. – Vol. 32. – P. 815–819.
142. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem*. – 1976. – №72. – P. 248–254.
143. Carvalho, K. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo / K. Carvalho, M.K. Campos, D.S. Domingues, L.F. Pereira, L.G. Vieira // *Mol. Biol. Rep*. – 2013. – Vol. 40. – P. 3269–3279.
144. Szabados, L. Proline: a multifunctional amino acid / L. Szabados, A. Savoure A// *Trends Plant Sci*. – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 89–97.
145. Chance, B. Assay catalase and peroxidase / B. Chance, A.C. Maehly // *Methods in Enzymology*. – N.Y.: Academic press, 1955. – P. 764–775.

146. Cook, C.D. A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae) / C.D. Cook, K. Urmi-König // *Aquat. Bot.* – 1984. – Vol. 19, № 1–2. – P. 73–96.
147. Day, J.A. Formation and fate of chlorophenol glycosides in an aquatic plant environment: doctoral thesis / J.A. Day. - Atlanta, 2002.
148. Dianati, R. A. Tilaki. Effect of glucose and lactose on uptake of phenol by *Lemna minor* / R. A. Dianati Tilaki // *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* – 2010, Vol. 7, No. 2, P. 123–128.
149. Demmig-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin / B. Demmig-Adams // *Biochimica et Biophysica Acta.*– 1990. – Vol. 1020. – P. 1–24.
150. Ensley, H.E. Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba* / H.E. Ensley, J.T. Barber, M.A. Polito, A.I. Oliver // *Environmental Toxicology and Chemistry.* – 1994. – Vol. 13. – P. 325–331.
151. Ensley, H.E. Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba*, duckweed / H.E. Ensley, H.A. Sharma, J.T. Barber, M.A. Polito; In E.L. Kruger, T.A. Anderson and J.R. Coats (eds), *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, ACS Symposium Series № 664. – Washington, DC: American Chemical Society, 1997. P. 238–253.
152. Compilation of data for priority organic pollutants for derivation of Soil Guideline Values/ Environment Agency. – Science Report SC050021/SR7. – Bristol: Environment Agency, 2008. – 160 p.
153. European Union Risk Assessment Report. Phenol / European Chemicals Bureau. - Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006. – Vol. 64. – P. 157.
154. Gill, S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in Abiotic stress tolerance in crop plants / S.S. Gill, N. Tuteja // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 48. – P. 909–930.

155. Gillner, M. Hydroquinone. Environmental health criteria, 157 / M. Gillner, G.A. Moore, H.Cederberg. – Geneva: World Health Organization, 1994. – 71 p.
156. Glass, A.D.M. Uptake of simple phenols by barley roots /A.D.M. Glass, B.A. Bohm // *Planta*. – 1971. – Vol. 100, № 2. – P. 93–105.
157. Gobas, F.A.P.C. Bioconcentration of chlorinated aromatic hydrocarbons in aquatic macrophytes / F.A.P.C. Gobas, E.J. Mc Neil, L. Lovett-Doust, G.D. Haffner // *Environmental Science and Technology*. – 1991. – Vol. 25. – P. 924–929.
158. Guillén, F. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical / F.Guillén, M.J. Martínez, C. Muñoz, A.T. Martínez // *Arch Biochem Biophys*. –1997. – Vol. 339. – P. 190–199.
159. Guillén F. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase / F. Guillén, V. Gómez-Toribio, M.J.Martínez, A.T. Martínez // *Arch Biochem Biophys*. – 2000. – Vol. 383(1). – P. 142–147.
160. Hafez, N. Accumulation of phenol by potamogeton crispus from aqueous industrial waste / N. Hafez, S. Abdalla, Y.S. Ramadan // *Environmental Contamination Toxicology*. – 1998. – Vol. 60.– P. 944–948.
161. Hahn, S.K. Resorcinol. Concise international chemical assessment document, 71 / S.K. Hahn, J Kielhorn, J. Koppenhöfer, A. Wibbertmann, I. Mangelsdorf. – Geneva: World Health Organization, 2006. – 71 p.
162. Hellström, A. Uptake of organic pollutants in plants department of environmental assessment swedish university of agricultural sciences /A.Hellström. - Uppsala, Sweden, 2004. – Режим доступа: <http://info1.ma.slu.se/IMA/Publikationer/internserie/2004-01.pdf>.
163. Hewitt, E.J. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant



tissuer / E. J. Hewitt, G. J. Dickes // The Biochemical Journal. – 1961. – Vol. 78, № 2. – P. 384–391.

164. Horton, P. Regulation of light harvesting in green plants / P. Horton, A.V. Ruban, R.G. Walters // Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1996. – Vol. 47. – P. 655–684.

165. Holst, R.W. An algal polyphenol oxidase: characterization of the o-diphenol-oxidase from the charophyte *Nitella mirabilis* / R.W. Holst, J.H. Yopp // Phycologia. – 1976. – Vol. 15, N 2. – P. 119–124.

166. Hu, C. Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases / C. Hu, R.B. Huystee // Biochem. J. – 1989. – Vol. 263. – P. 129–135.

167. Korte, F. Organic toxicants and plants / F. Korte, G. Kvesitadze, D. Ugrekhelidze [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2000. – Vol. 47. – P. 1–26.

168. Kvesitadze, G. Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation / G. Kvesitadze, M.Gordeziani, G. Khatisashvili [et al.] // Journal of Biological Physics and Chemistry. – 2001. – Vol. 1. – P. 49–57.

169. Lawlor, D.W. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth / D.W. Lawlor // New Phytologist. – 1970. – Vol. 69. – P. 501–513.

170. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes / H.K. Lichtenthaler // Methods in Enzymology / Eds. S.P. Colowick, N.O. Kaplan. – San Diego: Acad. Press, 1987. – Vol. 148. – P. 350–382.

171. Lockhart, W.L. Uptake and toxicity of organic compounds: studies with an aquatic macrophyte (*Lemna minor*) / W.L. Lockhart, B.N. Billeck, B.G.E.D. March, D.C.G. Muir // Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium, ASTM STP 802; Bishop W.E., Cardwell R.D. and Heidolph B.B. editors. – Philadelphia: American Society for Testing Materials. – 1981. – P. 460–486.

172. Miller, N.J. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls /N.J.Miller, J. Sampson, L.B. Candeias [et al.] // FEBS letters. – 1996. – Vol. 384. – P. 240–242.

173. Newsted, J.L. Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrum capricornutum*, a green alga / J.L. Newsted // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2004.– Vol. 59. – P. 237–243.

174. Nora-Malaver, Q. La bora (*Eichhhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laub.), alternativa para la eliminacion de fenol em aguas residuais / Q. Nora-Malaver, O. Jesús-Ramos //Acta Biologica Venezuelica. – 1997. – Vol.17, № 1. – P. 57–64.

175. Nzungu V.A. Sequestration and transformation of water soluble halogenated organic compounds using aquatic plants, algae and microbial mats / V.A. Nzungu, O'Niell, S.C. McCutcheon, N.L.Wolfe // Phytoremediation Transformation and Control of Contaminants. – New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., Chichester, 2003. – Chapter 16. – P. 499–528.

176. Park, J.S. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata* /J.S. Park, M.T. Brown, T. Han // Aquatic Toxicology. – 2012. – Vol. 15. – P. 106–107.

177. Polprasert , C. Application of constructed wetlands to treat some toxic wastewaters under tropical conditions / C. Polprasert, N.P. Dan, N. Thayalakumaran // Water Science and Technology. – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 165–171.

178. Raven, P.H. Biology of Plants / P.H. Raven, R.F. Evert, S.E. Eichhorn. – N. Y.: Worth Publishers, 1986. – 775 p.

179. Reinhold, D.M. Phytoremediation of fluorinated agrochemicals by duckweed / D.M. Reinhold, F.M. Saunders // American Society of Agricultural and Biological Engineers. – 2006. – Vol. 49 (6). – P. 2077–2083.

180. Rice-Evans, C.A. Flavonoids in health and disease / C.A. Rice-Evans, I. Packer. – N.Y.: Marcel Dekker, 1997. – 236 p.

181. Rodriguez-Lopez, J.N. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle / J.N. Rodriguez-Lopez, D.J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz [et al] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – P. 11838–11847.
182. Rodriguez-Lopez, J.N. Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase / J.N. Rodriguez-Lopez, L.G. Fenoll, P.A. Garcia-Ruiz [et al] // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 10497–10506.
183. Roy, S. Pentachlorophenol: uptake elimination kinetic and metabolism in an aquatic plant, *Eichhornia crassipes* / S. Roy, O.Hänninen // *Environmental Toxicology and Chemistry.* – 1994. – Vol.13. – Issue 5. – P. 763–773.
184. Siefermann-Harms, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photo synthetic membranes / D.Siefermann-Harms // *Physiologia Plantarum.* – 1987. – Vol. 69. – P. 561–568.
185. Saerong, K. The antioxidant response of *Lemna paucicostata* upon phenol exposure / K. Saerong, K. Hyunhee, P. Areum [et al.] // *Toxicology and Environmental Health Sciences.* – 2015. – Vol. 7. – P. 73–81.
186. Sanchez-Ferrer, A. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism / A. Sanchez-Ferrer, J.N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, F. Garcia-Carmona // *Biochim Biophys Acta.* – 1995. – V. 1247. – P. 1–11.
187. Schafer, W. Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Tetrachlorocatechol as a primary metabolite / W.Schafer, H. Sandermann // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1988. – Vol. 36. – P. 370–377.
188. Scragg, A.H. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1 / A.H. Scragg // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2006. – Vol.39. – P.796–799.
189. Seidel, K. Exkretion von phenol in der phylosphäre von *Spirpus lacustris* L. / K. Seidel, R. Kickuth // *Naturwissenschaften.* – 1967. V. 52. – P. 517–525.

190. Sharma, H.A. A comparison of the toxicity and metabolism of phenol and chlorinated phenols by *Lemna gibba*, with special reference to 2,4,5-trichlorophenol / H.A.Sharma, J.T.Barber, H.E. Ensley, M.A. Polito // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1997. – Vol. 16. – P. 346–350.
191. Siegel, B.Z. Plant peroxidases – an organismic perspective /B.Z. Siegel // *J. Plant Growth Regulation*. – 1993. – Vol. 12. – P. 303–312.
192. Smirnoff, N. Hydroxyl radicals scavenging activity of compatible solutes / N. Smirnoff, Q.J. Cubmes // *Phytochemistry*. –1989. –Vol. 28. –P. 1057–1059.
193. Sochtig, H. Beeinflussung des stoffwechsels der pflanzen durch humus und seine bestandteile und die auswirkung auf wachstum und ertrag / H. Sochtig // *Landbauforsch Volkenrode*, 1964. – V. 14. – P. 9–20.
194. Stahl, J.D. Biodegradation of nitroaromatic compounds / J.D. Stahl, S.D. Aust. –N.Y.: Plenum press, 1995. – P. 117–134.
195. Stiborova, M. What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochromes P-450 or peroxidases? (A hypothesis) / M. Stiborova, P. Anzenbacher // *General Physiology and Biophysiology*. – 1991. – Vol. 10. – P. 209–216.
196. Stom, D.I. About the role of quinines in the action of some polyphenols on the streaming of protoplasm in *Nitella* sp. cells / D.I. Stom, G.G. Ivanova, G.V. Bashkatova, T.P. Trubina, O.M.Kozhova // *J. Acta Hydrochim. Hydrobiol.* – 1974. – № 5. – P. 407–412.
197. Stom, D.I. Influence of polyphenols and quinones on aqueous plants and their blocking of SH-groups / D.I. Stom // *J. Acta Hydrochim. Hydrobiol.* – 1977 –№ 5 (3). – P. 291–298.
198. Stom, D.I. Some effects of polyphenols on aquatic plants. I. Toxicity of phenols in aquatic plants. *Bull Environ* / D.I. Stom, R. Roth // *Contam. Toxicol.* – 1981. – Vol. 27. – P. 332–337.
199. Stom, D.I. Method of analyzing quinones in water and their application on studying the effects of hydrophytes on phenols / D.I. Stom, S.S.

Timofeeva, H.F. Kashina, L.I. Bielykh // *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. – 1980. – № 8. – P. 231–240.

200. Stom, D.I. Some methods of phenol elimination from sewage waters / D.I. Stom, S.S. Timofeeva, S.N. Souslov // *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. – 1981. – № 9. – P. 433–445.

201. Stom, D.I. Influence of polyphenols and quinones on aqueous plants and their blocking of SH-groups / D.I. Stom // *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. – 1977. – № 5. – P. 291–298.

202. Tateoka, T.N. Studies on the catabolic pathway of protocatechuic acid in mung bean seedlings / T.N. Tateoka // *Bot. Mag.* – 1970. – Vol. 83. – P. 49–54.

203. Tefler, A.  $\beta$ -Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers / A. Tefler, S. Dhimi, S.M. Bishop [et al.] // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – P. 14469–14474.

204. Tront, Jacqueline M. Plant activity and organic contaminant processing by aquatic plants: a dissertation presented to the academic faculty / Jacqueline Maria Tront. – Atlanta, 2007. – 341 p.

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

206. Ugrekhelidze, D. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves / D. Ugrekhelidze, F. Korte, G. Kvesitadze // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1997. – Vol. 37. – P. 24–28.

207. Wolf S.D. Predicting chemical accumulation in shoots of aquatic plants / S.D. Wolf, R.R. Lassiter, S.E. Wooten // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – Vol.10. – 1991. – P. 655–680.

208. Wolverton, B.C. Water Hyacinths for removal of phenols from polluted waters / B.C. Wolverton, M.M. McKown // *Aquatic Botany*. – 1976. – Vol. 2. – P. 191–201.

209. Wood, B.I.B. Labelled tyrosinase from labelled substrate / B.I.B. Wood, L.L. Ingraham // *Nature*. – 1965. – Vol. – 205, № 4968. – P. 291–292.
210. Yarrow, M. The ecology of *Egeria densa* Planchón (Liliopsida: Alismatales): A wetland ecosystem engineer? / M. Yarrow, V.H. Marin, M. Finlayson [et al.] // *Revista Chilena de Historia Natural*, 2009. – Vol. 82, № 2. – P. 299–313.
211. Zaalishvili, G. Electron microscopic investigation of nitrobenzene distribution and effect on plant root tip cells ultrastructure / G. Zaalishvili, T. Sadunishvili, R. Scalla [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. – 2002. – Vol. 52. – P. 190–197.
212. Zhao-al, Z. Effects of phenols on algal gelis from green algae *Scenedesmus obliquus* (turp.) Kuetzing / Z. Zhao-al, C. Zi-ao // *Acta biological exp. Scinica*. – 1984. – Vol. 17, № 1. – P. 1–6.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**logK<sub>ow</sub>** – коэффициент распределения октанол / вода

**2,4-ДХФ** – 2,4-дихлорфенол

**2,4,5-ТХФ** - 2,4,5-трихлорфенол

**АО** – антиоксиданты

**АОС** – антиоксидантная система

**АФК** – активные формы кислорода

**в.д.**– восточной долготы

**ДДК** – диэтилдитиокарбамат натрия

**ДФО** – дифенолоксидаза

**ГП** –гваякол-специфичная пероксидаза

**ГХ** – гидрохинон

**Д** – длина волны

**н. у. м.** – над уровнем моря

**НЦБК** – Новолялинский целлюлозно-бумажный комбинат

**ПДК** – предельно допустимая концентрация

**ПОЛ** – перекисное окисление липидов

**ПХ** – пирокатехин

**р.**– река

**РР1** – рабочий раствор 1

**РР2** – рабочий раствор 2

**РЦ** – резорцин

**С** – концентрация

**Соавт.** – соавторы

**ССК** – светособирающий комплекс

**с.ш.** – северной широты

**ТБК** – тиобарбитуровая кислота

**ТБКРС** – ТБК-реагирующие соединения

**ТМ** – тяжелые металлы

**УрГУ** – Уральский государственный университет

**УрФУ** – Уральский федеральный университет

**ЦБЗ** – целлюлозно-бумажный завод

**ЦБК** – целлюлозно-бумажный комбинат

**ФС** – фенольные соединения

**ФС2** – фотосистема 2

**Хл** – хлорофилл